

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLEILDO PEREIRA DE SANTANA

**ESTUDO E AVALIAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS BIFUNCIONAIS PARA
APLICAÇÃO COMO MARCADORES ÓPTICOS E TRANSPORTADORES DE
FÁRMACO PARA O SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO**

BELO HORIZONTE

2021

CLEILDO PEREIRA DE SANTANA

**ESTUDO E AVALIAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS BIFUNCIONAIS PARA
APLICAÇÃO COMO MARCADORES ÓPTICOS E TRANSPORTADORES DE
FÁRMACO PARA O SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva
Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Herman Sander
Mansur

BELO HORIZONTE

2021

S232e Santana, Cleildo Pereira de.
Estudo e avaliação de pontos quânticos bifuncionais para aplicação como marcadores ópticos e transportadores de fármaco para o segmento posterior do olho / Cleildo Pereira de Santana. – 2021.
117 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientador: Herman Sander Mansur.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

1. Olhos – Doenças – Teses. 2. Neovascularização – Teses. 3. Fator de crescimento endotelial vascular – Teses. 4. Bevacizumab – Teses. 5. Pontos quânticos – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Mansur, Herman Sander. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:617.71



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO DE PONTOS QUÂNTICOS BIFUNCAIONAIS COMO MARCADORES ÓPTICOS E TRANSPORTADORES DE FÁRMACO PARA O SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO”

CLEILDO PEREIRA DE SANTANA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Isadora Cota Carvalho
Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez
Universidade de São Paulo - USPRP

Dra. Carolina Nunes da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Herman Sander Mansur - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Fonseca Vianna Lopez, Usuário Externo**, em 19/10/2021, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 19/10/2021, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Nunes da Silva, Usuário Externo**, em 19/10/2021, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isadora Cota Carvalho, Usuário Externo**, em 20/10/2021, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Herman Sander Mansur, Membro**, em 21/10/2021, às 12:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Stanisçuaski Guterres, Usuário Externo**, em 25/10/2021, às 07:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1023989** e o código CRC **0634C25E**.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, pela orientação e ensinamentos neste e em outros trabalhos, pela amizade e confiança ao longo desses anos, e por tantas oportunidades a mim concedidas;

Ao Professor Dr. Herman Sander Mansur e à Dra. Alexandra Mansur, pela oportunidade de colaboração, ensinamentos e por toda a ajuda neste trabalho;

À banca examinadora, pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho e pelas valiosas contribuições;

À CAPES, pelas bolsas concedidas no Brasil e no exterior;

Aos amigos do laboratório: Brenda, Cibele, Elisa, Lays, Marcela, Mayara, Nayara, Pedro, Raquel e Vinícius, pelos ensinamentos, ajudas e risadas compartilhadas, tornando o trabalho sempre mais leve;

A Graziella Rivelli e Lorena Vieira pela amizade, incentivo, cafés e risadas compartilhadas. Pela melhor equipe que formamos no trabalho no ecossistema de inovação de Minas Gerais;

A Francinalva Medeiros e Paulo Diniz pela amizade, apoio, cuidado e incentivo constante;

Às minhas grandes amigas Gisele, Joanda, Lianne, Malu, Monik, Monique, Railza e Tamires, pelo apoio e incentivo constante;

Às minhas grandes amigas/família Ádria Carreiro e Sandra Carreiro, por compartilharem comigo momentos felizes e momentos não tão felizes, diariamente;

Aos meus amados pais, Ildo Evangelista de Santana e Maria Fátima Pereira de Santana, pela confiança, apoio, cuidado, e amor dedicado;

Aos meus irmãos César e Celiane, pelo apoio, incentivo e cuidado;

Ao Professor Dr. Uday Kompella, pela oportunidade de colaboração e pelos ensinamentos durante o período na Universidade do Colorado, e após este. A Madhoosudan, Brock, Rachel e Jonathan por toda a ajuda;

A Carol, Ed e Faith Dettling, por todo o acolhimento, ajuda e amizade durante o período em Denver;

A Deus, por todas as bênçãos.

“Pensava que quando se sonha tão grande a realidade aprende.”

(Valter Hugo Mãe, O Filho de Mil Homens, 2011).

RESUMO

O olho é um órgão altamente especializado, dotado de uma conformação específica de suas estruturas que é fundamental para o desempenho da função visual. Distúrbios que acometem o interior do bulbo ocular tendem a ser altamente danosos, uma vez que comprometem a homeostase deste órgão. O olho possui também barreiras anatômicas que impedem a entrada de substâncias, incluindo fármacos, além de um mecanismo de *clearance* que remove rapidamente as substâncias de seu interior. Desta forma, doenças que acometem a retina estão entre aquelas que apresentam maior dificuldade no tratamento. Em muitos casos, ocorre a proliferação anormal de vasos sanguíneos (neovascularização) a partir das camadas inferiores à retina, com dano fisiológico e anatômico à sua estrutura, provocando a perda rápida e irreversível da visão. Diante disto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanossuspensões de pontos quânticos conjugados ao bevacizumabe, biofármaco utilizado no tratamento da neovascularização ocular, no intuito de otimizar sua terapêutica. Pontos quânticos com núcleos de CdS e de AgInS₂ recobertos com ZnS foram produzidos por rota aquosa, estabilizados com quitosana e conjugados ao bevacizumabe. Estes sistemas foram caracterizados quanto à sua absorção na região do ultravioleta-visível, fotoluminescência, rendimento quântico, espectro de absorção no infravermelho, potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico, morfologia por MET e composição química por espectroscopia de EDX. Os dados indicaram que as amostras apresentaram alta absorvidade entre 190 e 550 nm, condizente com o tipo de material utilizado em sua composição, e fotoluminescência entre cerca de 400 e 700 nm. A avaliação da absorção no infravermelho e do diâmetro hidrodinâmico confirmaram a conjugação do anticorpo à quitosana. A avaliação da biossegurança em animais, após sua administração por via intravítrea, foi feita por meio de eletrorretinografia, medida da pressão intraocular, avaliação histológica, morfométrica e imunohistoquímica. Não foram detectadas, por meio da eletrorretinografia, alterações significativas que sugerissem danos à função retiniana pelas amostras. Também não foram detectadas alterações significativas na pressão intraocular. Os cortes histológicos não apresentaram sinais de inflamação aguda, entretanto, houve indícios de dano tardio e de acumulação de partículas na retina. A atividade antiangiogênica foi avaliada em modelo de CAM, cujos resultados indicaram conservação da atividade do bevacizumabe. Os resultados sugerem que os pontos quânticos apresentam potencial como ferramenta teranóstica para a terapêutica da neovascularização ocular.

Palavras-chave: neovascularização; VEGF; bevacizumabe; pontos quânticos.

ABSTRACT

The eye is a highly specialized organ, endowed with a specific conformation of its structures that is fundamental for the visual function. Disorders that affect the interior of the eye bulb tend to be highly harmful, since they compromise the homeostasis of this organ. The eye also has anatomical barriers that prevent the entry of substances, including drugs, in addition to a clearance mechanism that quickly removes substances from its interior. Thus, diseases that affect the retina are among those that present greater difficulty in treatment. In many cases, there is an abnormal proliferation of blood vessels (neovascularization) from the layers below the retina, with physiological and anatomical damage to its structure, causing rapid and irreversible vision loss. Therefore, this work aimed to develop and characterize nanosuspensions of quantum dots conjugated to bevacizumab, a biodrug used in the treatment of ocular neovascularization, in order to optimize its therapy. Quantum dots with CdS and AgInS₂ cores coated with ZnS were produced by aqueous route, stabilized with chitosan and conjugated to bevacizumab. These systems were characterized for their absorption in the ultraviolet-visible region, photoluminescence, quantum yield, infrared absorption spectrum, zeta potential, hydrodynamic diameter, morphology by TEM and chemical composition by EDX spectroscopy. The data indicated that the samples showed high absorptivity between 190 and 550 nm, consistent with the type of material used in its composition, and photoluminescence between about 400 and 700 nm. The evaluation of infrared absorption and hydrodynamic diameter confirmed the conjugation of the antibody to chitosan. The evaluation of biosafety in animals, after its intravitreal administration, was performed by means of electroretinography, intraocular pressure measurement, histological, morphometric and immunohistochemical evaluation. No significant alterations that suggested damage to the retinal function by the samples were detected by means of electroretinography. Also, no significant changes in intraocular pressure were detected. Histological sections showed no signs of acute inflammation, however, there was evidence of late damage and accumulation of particles in the retina. The antiangiogenic activity was evaluated in a CAM model, whose results indicated conservation of the activity of bevacizumab. The results suggest that quantum dots have potential as a theranostic tool for the treatment of ocular neovascularization.

Keywords: neovascularization; VEGF; bevacizumab; quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estruturas que compõem o globo ocular.....	21
Figura 02 – Camadas que compõem a estrutura da retina.....	22
Figura 03 – Esquema de administração intravítrea no globo ocular.....	27
Figura 04 – Fundoscopia de um olho humano saudável.....	29
Figura 05 – Fundoscopias de olhos humanos com degeneração macular relacionada à idade.....	30
Figura 06 – Estrutura típica de um ponto quântico e diversas modificações de superfície possíveis.....	39
Figura 07 – Variação na emissão de fluorescência devido a modulação da energia de banda proibida com a variação do tamanho de pontos quânticos.....	40
Figura 08 – Esquema estrutural de um ponto quântico núcleo/casca.....	40
Figura 09 – Esquema da reação utilizada para conjugação do bevacizumabe à quitosana.....	49
Figura 10 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras CdS/ZnS (a) e ZAIS (b).....	58
Figura 11 – Espectros de emissão das amostras CdS/ZnS (a e b) e ZAIS (c e d).....	59
Figura 12 – Espectros de emissão tridimensionais das amostras CdS/ZnS (a e b) e ZAIS (c e d).....	60
Figura 13 – Espectros na região do infravermelho para as amostras avaliadas.....	61
Figura 14 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão.....	62
Figura 15 – Distribuição dos tamanhos de partícula encontrados na análise por MET, 63	
Figura 16 – Espectros de energia dispersiva de raios-x para as amostras.....	64
Figura 17 – Comparação dos parâmetros avaliados na vasculatura corioalantóica.....	65
Figura 18 – Imagens representativas das amostras avaliadas no modelo de CAM.....	66
Figura 19 – Perfis eletrorretinográficos referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.....	68

Figura 20 – Perfis eletrorretinográficos referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).	69
Figura 21 – Amplitudes das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	70
Figura 22 – Amplitudes das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).	71
Figura 23 – Tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	72
Figura 24 – Tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).	73
Figura 25 – Valores de relação B/A.	75
Figura 26 – Relações entre resposta e estímulo luminoso para as amostras estudadas. .	77
Figura 27 – Coeficientes Vmax, K e n nos dias avaliados	78
Figura 28 – Potenciais oscilatórios referentes às amostras testadas.....	79
Figura 29 – Avaliação global da resposta oscilatória frente às amostras testadas.	81
Figura 30 – Médias da pressão intraocular para as amostras nos tempos avaliados e suas linhas de tendência.....	83
Figura 31 – Imagens representativas dos cortes histológicos obtidos para as amostras estudadas.....	84
Figura 32 – Medida das camadas da retina a partir dos cortes histológicos.....	85
Figura 33 – Imagens representativas de secções de retina dos animais tratados com cada amostra, tratadas com TUNEL.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores obtidos de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das amostras.	61
Tabela 02 – Amplitudes e tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	74
Tabela 03 – Valores calculados da relação B/A referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	75
Tabela 04 – Valores de V_{\max} (cd.s.m^{-2}) referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	76
Tabela 05 – Pontos de semissaturação K (cd.s.m^{-2}) referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	76
Tabela 06 – Constantes de ganho n referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.	77
Tabela 07 - Dados dos potenciais oscilatórios para as amostras testadas.	80
Tabela 08 – Áreas sob as curvas (nV.ms) da resposta oscilatória das cobaias frente às amostras testadas.	82
Tabela 09 – Médias das medidas da pressão intraocular (mmHg) para as amostras nos tempos avaliados.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIS – Dissulfeto de prata e índio
- ATR – *Attenuated total reflectance* (refletância total atenuada)
- BM – *Bruch membrane*, (membrana de Bruch)
- CAM – *Chorioallantoic membrane* (membrana corioalantóica)
- CHI - Quitosana
- DLS – *Dynamic light scattering* (espalhamento dinâmico de luz)
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- EDC - Cloridrato de N-etil-N'-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
- EDX - Energia dispersiva de raios-x
- ELM – *External limiting membrane* (membrana limitante externa)
- ERG - Eletrorretinograma
- FTIR – *Fourier-transformed infrared* (infravermelho por transformada de Fourier)
- GCL – *Ganglion cell layer* (camada de células ganglionares)
- INL – *Inner nuclear layer* (camada nuclear interna)
- IPL – *Inner plexiform layer* (camada plexiforme interna)
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- NFL – *Neural fiber layer* (camada de fibra nervosa.)
- NIR – *Near infrared* (infravermelho próximo)
- ONL – *Outer nuclear layer* (camada nuclear externa)
- OPL – *Outer plexiform layer* (camada plexiforme externa)
- PIO – Pressão intraocular
- PKC – Proteína quinase
- PL – *Photoluminescence* (fotoluminescência)
- PLGA - Poli-ácido lático-co-ácido glicólico
- PQ - Pontos quânticos
- QY – *Quantum yield* (rendimento quântico)
- RPE – *Retina pigmented epithelium* (epitélio pigmentar da retina)
- Sulfo-NHS - Sal sódico de N-hidroxi-sulfossuccinimida
- UV - Ultravioleta
- VEGF – *Vascular endothelium growth factor* (fator de crescimento do endotélio vascular)
- ZP – *Zeta potential* (potencial zeta)

LISTA DE NOTAÇÕES E SÍMBOLOS

% - Porcento

± - Mais ou menos

°C – Grau Celsius

$\mu\text{g mL}^{-1}$ – Micrograma por mililitro

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

μM – Micromol

μV - Microvolt

AgInS_2 – Dissulfeto de prata e índio

AgNO_3 - Nitrato de prata

Cd – Cádmio

$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Perclorato de cádmio hidratado

cd.s.m^{-2} – Candela por segundo por metro quadrado

CdS – Sulfeto de cádmio

CdSe – Seleneto de cádmio

cm^{-1} – Ondas por centímetro

Da - Dalton

eV – Elétron-volt

g - Grama

GaAs – Arsenieto de gálio

h - Hora

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

$\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - Nitrato de índio hidratado

InAs – Arsenieto de índio

K - Kelvin

kV - Kilovolt

L - Litro

M – Molar

mg mL^{-1} – Miligrama por mililitro

mg/kg – Miligrama por quilograma

min - Minuto

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mol L⁻¹ – Mol por litro

ms - Milissegundo

mV - Milivolt

MΩ·cm – Megaohm por centímetro

Na₂S·9H₂O - Sulfeto de sódio hidratado

NaOH - hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

nV - Nanovolt

S - Enxofre

Zn - Zinco

Zn(NO₃)₂·6H₂O - Nitrato de zinco hidratado

ZnCl₂ - Cloreto de zinco

ZnS – Sulfeto de zinco

ZnSe - Seleneto de zinco

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 Anatomia do olho	19
2.1.1 Aporte sanguíneo.....	19
2.1.2 Córnea.....	19
2.1.3 Vítreo.....	20
2.1.4 Úvea.....	20
2.1.5 Retina.....	22
2.2 Vias oftálmicas de administração de fármacos.....	24
2.3 Neovascularização ocular	27
2.4 Uso de nanotecnologia na terapêutica ocular	33
2.4.1 Pontos quânticos.....	38
2.4.2 Funcionalização de pontos quânticos	41
2.4.3 Aplicações dos pontos quânticos na terapêutica.....	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral:	46
3.2 Objetivos específicos:.....	46
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 Síntese dos pontos quânticos	47
4.1.1 Materiais	47
4.1.2 Síntese dos pontos quânticos ZAIS (AgInS ₂ /ZnS).....	47
4.1.3 Síntese dos pontos quânticos CdS/ZnS	48
4.1.4 Bioconjugação do bevacizumabe aos pontos quânticos	49
4.2 Amostras.....	50
4.3 Caracterização dos pontos quânticos.....	51

4.3.1 Espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis)	51
4.3.2 Espectroscopia de fotoluminescência (PL).....	51
4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
4.3.4 Potencial zeta (ZP) e espalhamento dinâmico de luz (DLS)	52
4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	52
4.4 Avaliação da atividade antiangiogênica	53
4.5 Grupos de animais e administração das amostras	53
4.6 Eletroretinografia (ERG).....	54
4.7 Avaliação histológica	56
4.8 Análise estatística	57
5 RESULTADOS	58
5.1 Caracterização óptica e físico-química.....	58
5.1.1 Espectrofotometria na região do UV-Visível	58
5.1.2 Espectro de fotoluminescência	59
5.1.3 Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico	60
5.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho.....	61
5.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	62
5.2 Análise da atividade antiangiogênica	64
5.3 Eletroretinografia	67
5.3.1 Eletroretinogramas	67
5.3.2 Relação entre as ondas B e A	75
5.3.3 Avaliação da sensibilidade da retina à luz.....	76
5.3.4 Potenciais oscilatórios	79
5.4 Avaliação da pressão intraocular (PIO).....	82
5.5 Avaliação histológica	83
6 DISCUSSÃO	87
6.1 Caracterização físico-química	87

6.2 Avaliação da atividade antiangiogênica	91
6.3 Eletroretinografia.....	92
6.4 Avaliação da pressão intraocular (PIO).....	95
6.5 Análise histológica e morfométrica	95
7 CONCLUSÕES.....	98
8 PERPECTIVAS FUTURAS	100
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

As doenças oculares estão entre aquelas que causam mais impacto na vida de seus portadores. Com o aumento da expectativa de vida nas últimas décadas, a incidência de doenças advindas processos degenerativos aumentou consideravelmente, principalmente das síndromes degenerativas da retina.

Algumas condições oculares, sobretudo aquelas que afetam as estruturas no interior do olho e, principalmente, seu segmento posterior, são capazes de alterar a homeostase deste órgão. Estas condições possuem alto potencial danoso uma vez que o olho apresenta diversas particularidades que possibilitam o desempenho da função visual, tais como a ausência de células do sistema imunológico, a ausência de drenagem linfática, alta organização e especialização celular e precisa localização e distribuição do aporte sanguíneo (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

O endotélio vascular compreende a porção mais interna dos vasos sanguíneos, que exerce diversas funções no controle da homeostase vascular, como a troca de sinais intracelulares, manutenção da permeabilidade vascular, cascata de coagulação e angiogênese, entre outros. Alterações no endotélio causadas por doenças oculares são capazes de gerar neste uma resposta inflamatória. Com isso, esta camada passa a produzir mediadores que induzem a formação de novos vasos sanguíneos (SANTOS MOTTA, COBLENTZ e MELO, 2008).

Diversas doenças oculares advêm do processo de neovascularização ocular. Dentre elas, a retinopatia diabética e a degeneração macular exsudativa destacam-se por sua incidência alta e crescente. Estas condições estão entre as maiores causas de perda visual evitável em todo o mundo.

A advento da bioterapêutica, em diversos campos da medicina, tem revolucionado o tratamento de doenças que até então possuíam prognósticos nada promissores. No campo das doenças neovasculares que afetam o olho, os biofármacos têm demonstrado alta eficiência, causando uma melhoria significativa em sua qualidade de vida.

Os avanços na Ciência de Materiais têm possibilitado otimizar a terapêutica de diversas doenças por meio do desenvolvimento de sistemas capazes de direcionar e prolongar a liberação de fármacos em diversos sítios do corpo humano. Um grande potencial de aplicação está também nos sistemas teranósticos, aqueles capazes de auxiliar o diagnóstico e o monitoramento da evolução de uma condição, ao mesmo tempo em que

atua no seu tratamento. Marcadores opticamente ativos são utilizados nestes sistemas por permitirem o monitoramento por imagem de células, órgãos e tecidos. Pontos quânticos, nanossistemas dotados de propriedades de fluorescência, têm se mostrado promissores como sistemas teranósticos, uma vez que são capazes de carrear grande variedade de fármacos, com diferentes propriedades biofarmacêuticas, em sua superfície.

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar sistemas nanoparticulados de pontos quânticos com o objetivo de carrear bevacizumabe para o segmento posterior do olho, para o tratamento de doenças neovasculares degenerativas da retina. O desempenho de partículas com núcleo de CdS, mais comuns e extensivamente estudadas, foi comparado ao de partículas com núcleo de AgInS₂, mais recentes e biocompatíveis.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Anatomia do olho

O olho é um órgão externo, situado na porção anterior da órbita craniana, e envolvido por uma camada de gordura e tecidos conectivos. Este órgão é composto por uma variedade de estruturas ([Figura 01](#)), internas e externas, cada uma dotada de funções específicas. As estruturas oculares mais significativas para a fundamentação deste trabalho serão descritas a seguir.

2.1.1 Aporte sanguíneo

A maior parte do suprimento sanguíneo para os olhos é fornecida pela artéria oftálmica, uma ramificação da artéria carótida, que adentra as órbitas através do mesmo canal que o nervo óptico. As principais ramificações da artéria oftálmica são: a artéria retiniana central, que se dispõe abaixo do nervo óptico, adentrando este a cerca de 1,0 cm de distância do olho; as artérias ciliares posteriores, que dão origem a várias ramificações que adentram o globo ao redor do nervo óptico, fornecendo o aporte sanguíneo para a coroide e para a porção intraocular do nervo óptico; a artéria lacrimal, que fornece sangue para as glândulas lacrimais; as artérias musculares, cujas ramificações penetram a esclera a cerca de 4 mm do limbo, e junto com as artérias ciliares, formam o círculo arterial que fornece sangue para a íris e o corpo ciliar (LANG, 2007).

2.1.2 Córnea

A córnea é uma estrutura elíptica, considerada a estrutura refrativa mais importante do olho, com cerca de 43 dioptrias. Desta forma, uma parte considerável dos problemas de visão estão relacionados a modificações na curvatura da córnea. As células da córnea são nutridas e oxigenadas através do filme lacrimal, do humor aquoso e da arcada capilar limbal. Várias terminações do braço nasociliar do nervo trigêmeo conferem a esta uma forte sensibilidade (LANG, 2007; DENNISTON e MURRAY, 2014).

A córnea é composta por quatro camadas: o epitélio, a camada de Bowman, o estroma e a membrana de Descemet. O epitélio é classificado como escamoso, estratificado e não-queratinizado, contendo cinco camadas de células colunares, que se

tornam achatadas à medida que se aproximam da superfície. A camada de Bowman é fina, e constituída por uma condensação de fibras colágenas provenientes do estroma. No estroma, as fibras colágenas estão arranjadas de maneira precisa e altamente ordenada. Ainda nesta camada, entre as fibras colágenas, estão queratócitos, que produzem colágeno, mucopolissacarídeos e glicosaminoglicanas. A transparência característica da córnea é conferida por um arranjo regular das fibras colágenas no estroma. A membrana de Descemet é uma membrana relativamente rígida, que confere à córnea certa resistência a choques e infecções (LANG, 2007; DENNISTON e MURRAY, 2014).

2.1.3 *Vítreo*

O vítreo é uma estrutura que preenche a maior parte do olho. É um gel aquoso formado por 99% de água, associada a uma rede de fibras colágenas e de ácido hialurônico. Esta estrutura está em constante contato com a lente, a zônula, o corpo ciliar, a retina e o disco óptico. A porção periférica do vítreo, denominada córtex, possui uma grande quantidade de fibrilas colágenas, organizadas paralelamente à superfície da retina, de maneira que apenas uma pequena porção se insere nesta de maneira perpendicular. A função destas fibrilas é manter o contato constante entre o vítreo e a retina, de maneira que o movimento do vítreo não acarrete danos à estrutura retiniana (BYE, MODI e STANFORD, 2013).

Na interface do vítreo existe a presença de uma barreira hemato-vítrea, que impede a entrada de moléculas de alto peso molecular no interior do vítreo, que poderiam acarretar modificações na estrutura do gel e perda da clareza visual. Assim como na barreira hematoencefálica, a integridade desta barreira é devido à presença de fortes junções celulares entre as células do endotélio ciliar. Condições como diabetes e hipertensão são capazes de alterar a estrutura dessas junções, e com isso, causar alterações nas propriedades do vítreo e da sua interface com a retina (BYE, MODI e STANFORD, 2013).

2.1.4 *Úvea*

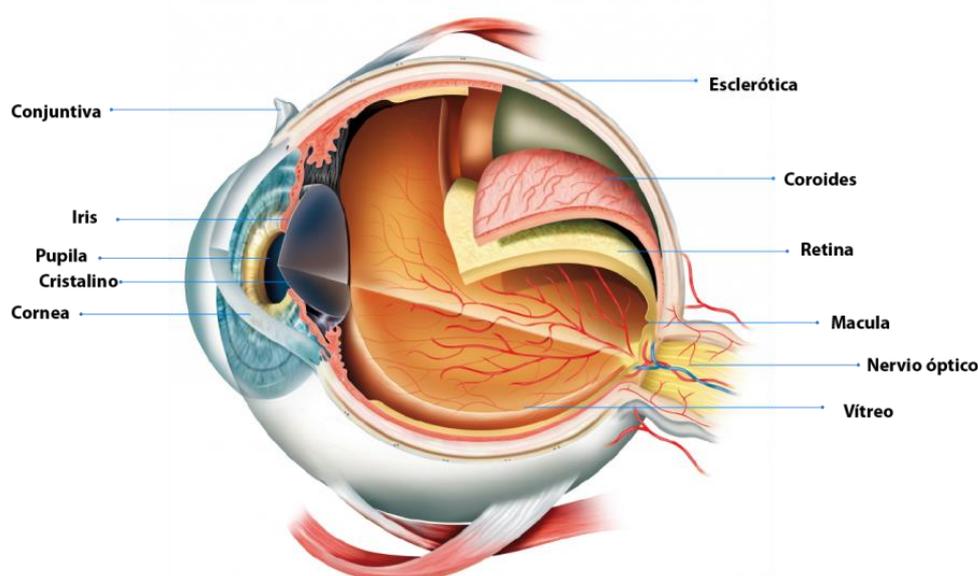
O trato uveal, ou úvea, compreende a porção vascularizada interna do olho. A úvea é formada por três estruturas, a íris, o corpo ciliar e a coroide, cada uma desempenhando uma função específica, descritas a seguir.

A íris está localizada entre o humor aquoso e a lente, e sua estrutura é composta por um estroma anterior e duas camadas posteriores de epitélio. Ambas as camadas são fortemente pigmentadas, conferindo aos olhos sua coloração individual característica. A íris apresenta uma abertura central que desempenha, nos olhos, uma função semelhante ao diafragma de uma câmara: controlar a entrada de luz. Esta função é possível graças aos músculos situados anteriormente à íris, denominados de esfíncter pupilar e dilatador pupilar (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

O corpo ciliar compreende uma estrutura situada entre a íris e a coroide. Sua porção superior (ou externa) está em contato com a esclera. A porção anterior do corpo ciliar forma estruturas finas denominadas processos ciliares. A porção posterior do corpo ciliar é lisa e denominada *pars plana*. Esta porção apresenta ligação com a retina, formando a *ora serrata* (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

A coroide consiste numa rede capilar de vesículas sanguíneas, localizada entre a esclera e a camada inferior da retina (epitélio pigmentado), circundando todo o globo ocular. Desta forma, é responsável por nutrir a porção externa da retina. A coroide apresenta uma coloração marrom escura, conferida a ela pela presença de células pigmentadas entre as vesículas sanguíneas, com isso, também desempenha a função de impedir a difusão de luz do meio externo para dentro do olho (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

Figura 01 – Estruturas que compõem o globo ocular.



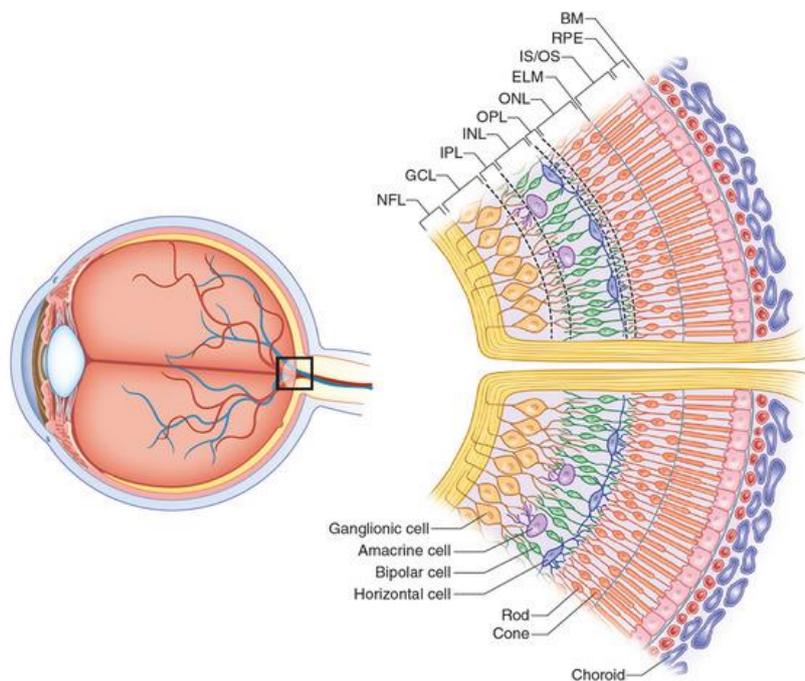
Fonte: <http://hanatemplate.com>.

2.1.5 Retina

A retina compreende a camada mais interna do globo ocular, possuindo a importante função de criar impulsos nervosos a partir da luz que incidente. A porção mais externa da retina está em contato com a coróide, enquanto sua porção mais interna se encontra em contato direto com o vítreo.

A estrutura da retina ([Figura 02](#)) é bastante complexa, sendo formada pela superposição de camadas de células com diferentes funções, que atuam em conjunto para formar a transdução de sinais. No total, são consideradas dez camadas na retina, dentre as quais nove possuem função neurossensorial. As camadas são: membrana limitante interna, camada de fibras nervosas, camada de células ganglionares, camada plexiforme interna, camada nuclear interna, camada plexiforme externa, camada nuclear externa, membrana limitante externa, camada de fotorreceptores e epitélio pigmentar da retina (BYE, MODI e STANFORD, 2013; FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

Figura 02 – Camadas que compõem a estrutura da retina.



BM – membrana de Bruch; RPE – epitélio pigmentar da retina; IS/OS – camada de fotorreceptores; ELM – membrana limitante externa; ONL – camada nuclear externa; OPL – camada plexiforme externa; INL – camada nuclear interna; IPL – camada plexiforme interna; GCL – camada de células ganglionares; NFL – camada de fibra nervosa.

Fonte: <http://www.clokoftalmologia.com.br>.

As camadas limitantes interna e externa são formadas principalmente pela junção de processos das células de Müller. Essas células, por sua vez, possuem natureza neuroglial, e estão a dispostas de maneira a radial na retina (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

A camada de células ganglionares possui a função de integrar impulsos provenientes dos fotorreceptores, que em seguida serão transmitidos para as fibras nervosas. Essa camada é formada por diferentes tipos de células ganglionares, cada uma com diferentes funções, dentre elas a integração de impulsos provenientes de diferentes regiões da retina, amplificação de impulsos provenientes de fotorreceptores, entre outras. Dentre os tipos de células nesta camada podem ser citadas as células M, as células P, as células bipolares e as células gliais (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

As camadas plexiformes interna e externa são formadas pelos axônios de fibras nervosas ou processos celulares provenientes de outras camadas. Na camada plexiforme interna estão compreendidos os processos de células bipolares, células de amacrina e células ganglionares. Na camada plexiforme externa estão compreendidos processos de fotorreceptores e células bipolares. De maneira geral a função das camadas plexiformes interna e externa é realizar a comunicação e integração entre as funções desses diferentes tipos de células (BYE, MODI e STANFORD, 2013; FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

A camada nuclear interna contém os corpos celulares das células bipolares, de amacrina, horizontais e células de Müller. As células bipolares possuem a função de conectar fotorreceptores e células ganglionares. Existem diferentes tipos de células bipolares como aquelas que conectam bastonetes, cones ou células P às sinapses das células ganglionares. As células de amacrina conectam as células ganglionares entre si, garantido que as células ganglionares que estão dispostas horizontalmente também sejam excitadas. As células horizontais são células multipolares, dispostas horizontalmente, que integram as informações transmitidas entre células bipolares e fotorreceptores. Essas células se conectam de maneira específica com cones e bastonetes e liberam ácido gama-aminobutírico em resposta ao estímulo dos fotorreceptores. Desta forma, ocorre uma inibição da atividade de células bipolares e, com isso, um aumento do contraste da imagem, com conseqüente aumento da resolução espacial. As células de Müller são semelhantes às células neurogliais e além de formar as camadas limitantes interna e externa, também são responsáveis por parte da estrutura da camada hemato-ocular (BYE, MODI e STANFORD, 2013).

Existem dois tipos de fotorreceptores na retina, os bastonetes e os cones. Os bastonetes possuem alta sensibilidade à luz, sendo responsáveis pela visão em baixa luminosidade. Os cones são adaptados para estímulos com grandes quantidades de luz, e são responsáveis pela resolução de cores na visão humana (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

Existem cerca de 120 milhões de bastonetes em toda a retina. Eles estão dispostos de maneira tal que sua densidade de distribuição aumenta à medida que se aproxima da fóvea, entretanto, não existe bastonetes na fóvea. Existem cerca de 7 milhões de cones na retina, sendo esses principalmente dispostos na fóvea. À medida que se distancia dessa região, sua densidade de distribuição diminui rapidamente (FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

A macula é uma área oval, localizada no pólo posterior do olho. Nesta região existe alta densidade de células ganglionares e de cones, conferindo a esta uma alta sensibilidade e tornando-a uma das regiões nobres da função visual (BYE, MODI e STANFORD, 2013; FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

O epitélio pigmentar da retina consiste em uma camada simples de células hexagonais localizadas desde a margem do nervo óptico até a *ora serrata*. Estas se dispõem em contato constante com a coroide e também possuem função de isolar retina da circulação sistêmica. Além disso, o epitélio possui importante função no metabolismo da retina, participando da renovação dos pigmentos fotossensíveis através da reposição de vitamina A (BYE, MODI e STANFORD, 2013; FLAMMER, MOZAFFARIEH e BEBIE, 2013).

2.2 Vias oftálmicas de administração de fármacos

Os avanços que foram feitos no desenvolvimento de fármacos mais eficazes no tratamento de inflamações e neovascularização ocular têm tido sua aplicabilidade freada pelas dificuldades na liberação e absorção destes em sítios específicos da estrutura ocular, sobretudo quando se trata de segmentos posteriores do olho. Isto se deve à presença, na estrutura ocular, de diversas barreiras que limitam a absorção de fármacos (GAN et al., 2013).

O conjunto de barreiras intrínsecas presente na estrutura ocular, importante para manter as funções oculares vitais, compreende as barreiras corneana, hemato-aquosa e hematorretiniana. Além disso, o filme lacrimal também apresenta comportamento de

barreira, devido à sua alta taxa de renovação e camada *gel-like* formada pelo conteúdo de mucina no muco lacrimal (GAN et al., 2013).

A administração ocular de soluções tópicas de fármacos apresenta uma dificuldade para a adesão do paciente ao tratamento, devido principalmente à frequência de dosagem, usualmente sendo necessária a aplicação de 2 a 3 gotas do medicamento a cada duas ou três horas. Essa necessidade surge pela ação da drenagem lacrimal, de maneira que, quando o medicamento é administrado, esta drenagem e o piscar dos olhos fazem com que a concentração do fármaco no local diminua em uma grandeza de 10 vezes em um intervalo de 4 a 20 minutos. Diante disso, os fármacos aplicados como soluções tópicas apresentam biodisponibilidade ocular reduzida a cerca de menos de 5% da dose, desta forma, surge o interesse em aumentar o tempo de permanência do medicamento na mucosa oftálmica (GUPTA et al., 2013).

A via sistêmica de administração de fármacos é por vezes preferidas por fornecer maior comodidade para o paciente. No entanto, a biodisponibilidade ocular de fármacos administrados por essa via é bastante limitada pela presença da barreira hematorretinal, que favorece a absorção apenas de fármacos lipofílicos. Estima-se que apenas 1 a 2% da dose do fármaco administrado se torna disponível na barreira hematorretinal, o que implica na necessidade de altas dosagens do medicamento e conseqüentemente gera uma grande frequência de efeitos colaterais sistêmicos (KAUR e KAKKAR, 2014).

No intuito de melhorar a disponibilidade de fármacos nestes sítios, a via de administração sistêmica tem sido substituída por outras vias, como as perioculares e as intraoculares. Nestes casos, o ato da administração (por meio de injeções) e a frequência necessária dificultam a terapêutica por apresentar riscos de complicações e reduzir a adesão do paciente (FALAVARJANI e NGUYEN, 2013).

A administração intravítrea de medicamentos ([Figura 03](#)) é realizada para medicamentos sob as formas de solução, suspensão ou implantes. Formas líquidas são administradas diretamente no humor vítreo via *pars plana*, com o uso de uma agulha de até 30 gauge. Para o olho humano, embora este comporte injeções de até 400 μL , usualmente um volume entre 150 e 200 μL é administrado, para maior segurança. A principal vantagem desta forma de administração é a imediata disponibilidade do fármaco em alta concentração no interior do olho, com grande potencial para a ação sobre a coróide e a retina. Entretanto, fármacos de peso molecular inferior a 500 Da tendem a ser rapidamente drenados desta região, apresentando assim uma meia-vida curta, o que torna necessária a reaplicação frequente do medicamento. A administração intravítrea

frequente, ainda que de forma espaçada, gera riscos de complicações como hemorragia vítrea, descolamento de retina, catarata e endoftalmite; estes riscos, associados à natureza invasiva e por vezes dolorosa do procedimento, são fatores críticos que reduzem a adesão ao tratamento (KAUR e KAKKAR, 2014).

Alguns dos riscos da administração intravítrea independem da natureza do distúrbio tratado, sendo associados principalmente a falhas técnicas no procedimento (FALAVARJANI e NGUYEN, 2013):

- A endoftalmite infecciosa é tida como um dos mais preocupantes riscos, e está relacionada a falhas na assepsia do procedimento e à não-observação de processos infecciosos existentes no local da aplicação;
- O surgimento de inflamações intraoculares não-infecciosas é bastante relacionado à administração intraocular de agentes anti-VEGF, e tem sido observada principalmente para ranibizumabe, bevacizumabe e aflibercept.
- A ocorrência de descolamento de retina regmatogênico tem sido associado a procedimentos incorretos de administração, com uso de agulhas inapropriadas e ocorrência de refluxo vítreo;
- O aumento da pressão intraocular é um efeito colateral conhecido desta rota de administração, e geralmente cessa poucas horas após a aplicação do medicamento. Entretanto, complicações deste efeito, quando ocorrem, costumam demandar intervenções anti-glaucoma tópicas ou cirúrgicas.
- A hemorragia intraocular, também associada a procedimentos incorretos de administração, oferece riscos de ocorrência de eventos tromboembólicos e descolamento coroidal.

Uma rota de administração considerada menos invasiva é a periocular, que compreende as regiões adjacentes ao olho, como a subconjuntival, peribulbar, justaescleral, subtenoniana e retrobulbar. Embora esta via não ofereça uma disponibilidade do fármaco tão alta quanto a intravítrea, esta é preferida por ser considerada menos invasiva. Ainda assim, a biodisponibilidade ocular fornecida por essa rota costuma ser superior àquelas fornecidas pelas vias intravenosa, tópica e oral (KAUR e KAKKAR, 2014).

Figura 03 – Esquema de administração intravítrea no globo ocular.



Fonte: <https://ioc.med.br/>

O espaço supracoroidal também tem sido utilizado como sítio de administração de medicamentos oftálmicos, principalmente para fármacos destinados à ação no segmento posterior do olho. É importante observar que a administração neste sítio não sofre efeitos limitantes de absorção causados por barreiras cinéticas como a membrana interna limitante e a esclera; desta forma, medicamentos administrados nessa região podem ser rapidamente drenados. Assim, torna-se evidente a necessidade da utilização de sistemas de liberação controlada para fármacos administrados por essa via (KOMPELLA et al., 2013).

Além dos diferentes métodos de administração de fármacos por via oftálmica, outras abordagens têm sido estudadas no intuito de melhorar a biodisponibilidade destes na mucosa oftálmica. O uso de profármacos se mostra como uma alternativa por possibilitar alterações na solubilidade, aumentar o tempo de residência e melhorar a estabilidade química do fármaco, bem como seu metabolismo *in loco*. Como exemplo, podemos citar o caso da dipivefrina, um éster da epinefrina 600 vezes mais lipofílico capaz de permear a córnea numa extensão 17 vezes maior proporcionando uma concentração corneana 10 vezes maior do que a molécula original (ACHOURI et al., 2012).

2.3 Neovascularização ocular

A neovascularização ocular é uma importante complicação de algumas doenças intraoculares. Este processo compreende o crescimento patológico de vasos e vesículas

sanguíneas na coroide, membrana de Bruch e retina. Estas estruturas estendem seu crescimento até o espaço sub-retinal, frequentemente na região da mácula, onde a permeação de fluidos provenientes da vasculatura pode causar descolamento retinal e formação de cicatrizes, levando a perda da visão central (BAXTER et al., 2013).

A neovascularização ocular é mais prevalente em pacientes com quadro de uveíte posterior e panuveíte, sendo pacientes do sexo feminino com idade média de 38 anos as mais afetadas. A presença de processo inflamatório é tida como crítica para o surgimento da neovascularização, uma vez que macrófagos ativados e outras células inflamatórias secretam enzimas que danificam células e causam degradação na membrana de Bruch (BAXTER et al., 2013).

Outra importante condição neovascular é a retinopatia diabética, uma complicação microvascular do diabetes mellitus, considerada atualmente a principal causa de cegueira na população ocidental em idade economicamente ativa. A diminuição da perfusão sanguínea na retina é a primeira alteração evidenciada nesse quadro, e a consequente diminuição do aporte sanguíneo causa diversas alterações metabólicas e bioquímicas de caráter inflamatório. Como consequências imediatas, é notada a degeneração do endotélio vascular, desestabilização da microvasculatura, hipertensão local e ruptura da barreira hematorretiniana (COSTAGLIOLA et al., 2015).

Pelo menos 4 vias bioquímicas estão associadas ao desenvolvimento da retinopatia diabética: aumento do fluxo na via dos poliois, aumento da formação de produtos de glicação avançada, ativação da formação de isoformas da proteína quinase (PKC), e aumento no fluxo da via das hexosaminas. Com alterações nessas vias, é relatado o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias da retina, com consequente aumento do estresse oxidativo (COSTAGLIOLA et al., 2015).

Processos de neovascularização estão envolvidos em alterações permanentes em diversas estruturas oculares (como visto ao comparar-se as figuras [04](#) e [05](#)), como a mácula, epitélio pigmentar da retina, capilares coroidais, fotorreceptores e membrana de Bruch, o que explica o alto risco de perda da capacidade visual. Além disso, a rápida formação de novos vasos leva ao surgimento de frágeis estruturas contendo sangue, cujo rompimento leva a sangramentos que comprometem a funcionalidade das estruturas adjacentes (CASCELLA et al., 2014).

Os fatores envolvidos no crescimento fisiológico de vasos sanguíneos são muito estudados. Em 1948, Isaac Michaelson formulou que um fator químico difusível, o qual denominou de “fator x”, seria responsável por guiar o crescimento normal e patológico

de vesículas sanguíneas. Em 1987, Ferrara e colaboradores conseguiram elucidar a sequência de aminoácidos de uma proteína envolvida no processo de neovascularização, a qual denominaram de “fator de crescimento do endotélio vascular” (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Eles isolaram sequências de DNA que codificam isoformas dessa proteína, contendo 121, 165 e 189 aminoácidos, sendo denominados VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉, respectivamente. Posteriormente, uma outra isoforma do VEGF, com 206 aminoácidos, também foi descoberta. As isoformas 121 e 165 são livremente difusíveis, enquanto as isoformas 189 e 206 estão ligadas na superfície celular ou na matriz extracelular. Com isso, Ferrara propôs que quanto maior a cadeia do VEGF, mais provavelmente este funcionaria como uma forma de armazenamento do fator, enquanto as moléculas menores desempenhariam uma função mais dinâmica (NGUYEN e GUYMER, 2015).

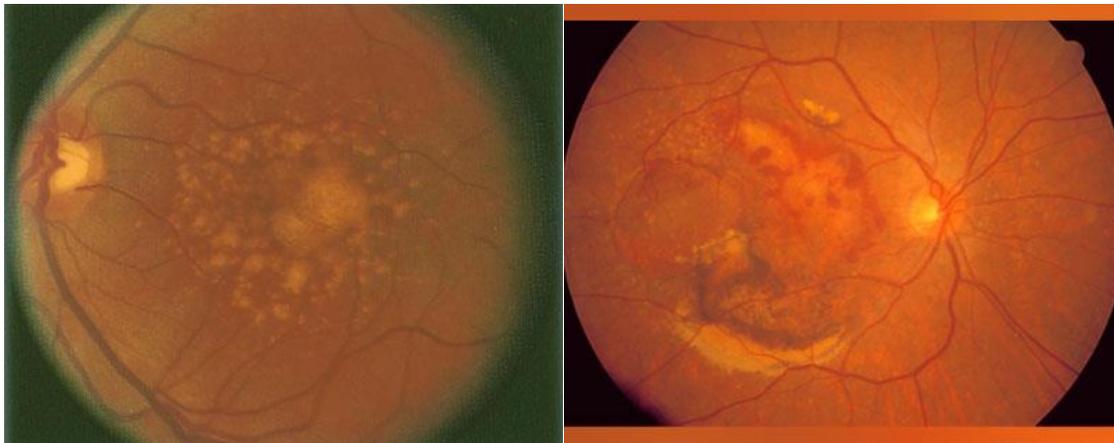
Tecidos oculares normalmente avasculares podem se vascularizar nos quadros inflamatórios, devido a desequilíbrios de estímulos angiogênicos. Dentre estes estímulos, destaca-se a presença dos VEGFs, um grupo de isoformas peptídicas dentre o qual se destaca o VEGF-a, tido como o principal regulador da hemangiogênese em humanos. Este, por sua vez apresenta a capacidade de promover a proliferação e migração de células endoteliais, formação de tubos, além de facilitar a permeabilidade vascular, promover a quimiotaxia de monócitos e produção de linfócitos B, desta maneira, tendo importante participação em processos inflamatórios (CHANG et al., 2012).

Figura 04 – Fundoscopia de um olho humano saudável.



Fonte: American Academy of Ophthalmology.

Figura 05 – Fundoscopias de olhos humanos com degeneração macular relacionada à idade.



Fonte: American Academy of Ophthalmology.

Grandes avanços para o tratamento de distúrbios oculares foram alcançados recentemente em função das descobertas dos mecanismos envolvidos no processo de angiogênese ocular. Sobretudo, as terapias específicas anti-VEGF têm mostrado grande eficácia frente a diversas complicações oculares da neovascularização (HOSSEINI et al., 2012).

Inicialmente, nos anos 1980, a única terapia disponível para o tratamento da neovascularização era a fotocoagulação a laser. O tratamento consiste na aplicação de um feixe laser (verde) para cauterizar vesículas exsudativas sub-retinais. Entretanto, esse tratamento provoca uma neovascularização recorrente e persistente, o que reduz a eficácia final do tratamento. Além disso, a destruição de células da retina em regiões nobres da função visual pode prejudicar ainda mais a visão dos pacientes, e por isso, esse tratamento é preferível para aplicação nas regiões extrafoveal e justafoveal apenas. A terapia fotodinâmica com verteporfina se tornou disponível após a formulação do Visudyne®, uma formulação lipossomal que, injetada por via sistêmica, deposita o fármaco em vesículas sanguíneas patológicas. Após ativação por um feixe de menor energia (vermelho) produz radicais livres que danificam as células endoteliais induzem agregação plaquetária e, com isso, cauteriza os sítios de sangramento (LAI e LANDA, 2015).

Com a aprovação dos medicamentos anti-VEGF pelo FDA em 2004 para uso em humanos, o pegaptanib (Macugen[®], Bausch & Lomb) foi o primeiro fármaco anti-VEGF utilizado na terapêutica ocular, no tratamento da degeneração macular relacionada à idade. O fármaco é um RNA aptâmero contendo 28 pares de bases, que se liga especificamente e com alta afinidade ao domínio ligante de heparina do VEGF₁₆₅, e dessa forma o impede de se ligar aos seus receptores. Esse fármaco caiu rapidamente em desuso com o advento de outros agentes anti-VEGF mais potentes e também mais abrangentes, porém, em alguns casos, é utilizado como terapia de manutenção, devido aos seus baixos efeitos colaterais em comparação com os outros fármacos da mesma classe (LAI e LANDA, 2015; NGUYEN e GUYMER, 2015).

O bevacizumabe (Avastin[®], Roche) foi aprovado pelo FDA no mesmo ano e tornou-se rapidamente o medicamento de escolha pelos oftalmologistas, antes da aprovação do ranibizumabe (Lucentis[®], Novartis) em 2006. Uma vez que ambos apresentam eficácia semelhante, e o primeiro apresenta um custo notoriamente menor, este se mantém sendo o agente anti-VEGF mais utilizado até hoje, ainda que de forma *off-label*. Estudos apontam que ambos os medicamentos têm efeitos semelhantes sobre a acuidade visual, quando administrados em protocolo semelhante, durante um ano. Alguns autores sugerem que o bevacizumabe apresenta menor risco de causar efeitos arteriotrombóticos, porém de maneira não conclusiva (BERG et al., 2015).

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que inibe todas as formas do VEGF. Uma vez que o ranibizumabe consiste na porção Fab desse anticorpo, ambos os fármacos apresentam os mesmos sítios ativos de ligação ao VEGF. Entretanto, o segundo apresenta propriedades farmacológicas diferentes do primeiro, como tamanho e peso molecular, potencial de penetração tecidual e tempo de meia vida. Diferentemente do bevacizumabe, o ranibizumabe é aprovado pelo FDA para o tratamento de neovascularização ocular, na degeneração macular relacionada à idade (LAI e LANDA, 2015).

O bevacizumabe é a molécula matriz da qual o ranibizumabe foi derivado, sendo ambas as patentes propriedades da mesma companhia. O bevacizumabe foi licenciado para o uso no tratamento de câncer colorretal metastático, para o qual a sua dosagem é cerca de 1000 vezes maior do que aquela utilizada para o uso intraocular. Uma vez que esses fármacos atuam sobre todas as classes de VEGF, ambos possuem potencial para promover importantes efeitos colaterais, como por exemplo, alterar arquitetura fenestrada típica da vasculatura coroidal, e com isso causar, a longo prazo, mudanças atroficas na

retina neural, no epitélio pigmentar da retina e nos tecidos e células vasculares (CHAKRAVARTHY et al., 2015).

O ranibizumabe foi desenvolvido no intuito de prevenir possíveis reações imunogênicas que um anticorpo como o bevacizumabe poderia desencadear quando administrado no olho humano, sendo essas reações mediadas pelo sistema complemento após a interação entre a porção Fc do bevacizumabe com receptores em células imunes. O ranibizumabe é tido como 10 a 20 vezes mais potente do que o bevacizumabe em inibir os efeitos do VEGF. Entretanto, o alto custo deste fármaco em comparação ao bevacizumabe é tido como o principal fator que dificulta a difusão do seu uso (NGUYEN e GUYMER, 2015).

O aflibercept (Eylea[®], Bayer), inicialmente chamado de *VEGF Trap-eye*, é um biofármaco aprovado pelo FDA em no ano de 2011, para o tratamento de degeneração macular exsudativa. Sua formulação foi elaborada especificamente para administração no ambiente vítreo, reduzindo o risco de toxicidade ocular. Sua molécula é uma proteína recombinante totalmente humanizada, que agrega em sua estrutura porções ligantes de receptores humanos para VEGF, fundindo a porção Fc da IgG1 humana com o segundo domínio de ligação do VEGFR1 e o terceiro domínio de ligação do VEGFR2. Com isso, a molécula possui a capacidade de se ligar a todas as isoformas do VEGF com maior afinidade do que os seus receptores nativos. Essa molécula também possui afinidade para os fatores de crescimento placentário (PIGFs) 1 e 2. A afinidade do aflibercept pelas isoformas do VEGF-A é cerca de 94 vezes maior do que a do ranibizumabe e cerca de 120 vezes maior do que a do bevacizumabe (BALARATNASINGAM et al., 2015).

O aflibercept, após ser administrado por meio de injeção intravítrea, atua como um receptor solúvel no meio ocular. Ele é rapidamente distribuído na retina, ao mesmo tempo em que é lentamente absorvido para a circulação sistêmica, onde é detectado a uma concentração máxima de 0,02 µg/ml em um período de 1 a 3 dias, com essa concentração se tornando indetectável após um período de cerca de duas semanas. A concentração máxima do fármaco detectada na circulação sanguínea é cerca de 50 a 500 vezes menor do que a concentração necessária para provocar efeitos sistêmicos em modelos animais. Uma vez que esse fármaco atua pelo bloqueio de diferentes tipos de fatores da neovascularização e também pelo fato de sua meia-vida ser cerca de 18 dias maior do que o do ranibizumabe, esse fármaco é tido como a primeira escolha nos casos de terapia anti-VEGF para pacientes refratários aos outros fármacos (GARCÍA-LAYANA et al., 2015).

De maneira geral, a eficácia do aflibercept 2,0 mg, do ranibizumabe 0,5 mg e do bevacizumabe 1,25 mg intravítreos no tratamento da degeneração macular relacionada à idade são comparáveis, entretanto, o último aparenta induzir maior índice de efeitos colaterais (SCHMID et al., 2015).

O conbercept é uma proteína combinante de fusão, como o aflibercept, que agrega o segundo domínio de ligação do VEGFR1, e os terceiro e quarto domínios de ligação do VEGFR2 com a porção constante da IgG1 humana. Dessa forma, a diferença entre a estrutura do conbercept e do aflibercept é que a do primeiro é maior, contendo o quarto domínio de ligação do VEGFR2. Em comparação com o aflibercept, o conbercept possui uma menor taxa de dissociação do VEGF, uma maior afinidade de ligação, uma menor taxa de adesão à matriz extracelular e um menor ponto isoelétrico, que resulta em um tempo de *clearance* menor. Sua afinidade pelo VEGF é a cerca de 50 vezes maior do que a do bevacizumabe e cerca de 30 vezes maior do que a do ranibizumabe (NGUYEN e GUYMER, 2015).

A neovascularização patológica tem sido alvo de estudos constantes, por se tratar de um processo envolvido não só na patogênese de doenças oculares. Estes estudos têm gerado novas moléculas que se encontram em investigação pré-clínica ou clínica, sendo fortemente promissoras para terapêutica (LAI e LANDA, 2015; VILLEGAS et al., 2017):

- Fovista (Ophtotech): um inibidor do fator de crescimento derivado de plaquetas, necessário para o amadurecimento e revestimento de células endoteliais. Ao ser bloqueado, impede a maturação de novas vesículas sanguíneas;
- Pazopanib (Voitrent[®], Glaxo Smith Kline) e Regorafinib (Stivarga[®], Bayer): inibidores de tirosina quinase, enzima de transdução de sinal dos receptores VEGFR1 e VEGFR2;
- Brolucizumabe (Alcon, Novartis): é o menor fragmento de anticorpo humanizado, pesando 26 kDa, que se liga a todas as isoformas do VEGF. O desenvolvimento deste fármaco foi realizado com o intuito de apresentar elevada capacidade de permeação no espaço sub-retinal.

2.4 Uso de nanotecnologia na terapêutica ocular

A utilização de nanopartículas carregadas com fármacos tem possibilitado uma melhora na eficácia, na segurança e na adesão de tratamentos oftálmicos desta natureza.

Atribui-se isto à capacidade desta forma farmacêutica de encapsular eficientemente o fármaco, controlar sua liberação e absorção. Aliado a isso, alguns destes nanossistemas apresentam também propriedades de marcação específica de células e tecidos, que possibilitam seu uso como ferramentas de diagnóstico.

A configuração específica da estrutura ocular demanda dois fatores que determinam a biodisponibilidade de fármacos no olho: a duração do medicamento na superfície ocular e a permeabilidade corneana. Quando se lança mão de nanopartículas, sobretudo lipídicas, nesta via, ambos os fatores são atendidos. O primeiro porque, uma vez que a matriz das partículas é capaz de interagir com a camada lipídica do filme lacrimal, o fármaco tem a possibilidade de permanecer em contato com a camada conjuntival por um período maior, que age como um reservatório. O segundo fator é atendido pelo fato de que a barreira corneana, formada por 5 a 6 camadas de células firmemente justapostas, é permeável apenas a substâncias dotadas de lipofilicidade específica, porém susceptível à ação de surfactantes não-iônicos e outros agentes de permeação frequentemente incorporados nestas formulações, que facilitam a passagem do fármaco (GAN et al., 2013).

Diversos tipos de sistemas nanométricos têm sido estudados quanto à possibilidade de utilização em formulações oftálmicas. Microemulsões, nanossuspensões, nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas), nanopartículas lipídicas sólidas, niossomas, dendrímeros e lipossomas já são considerados alternativas para solucionar problemas farmacotécnicos observados principalmente em fármacos de baixa solubilidade, como dexametasona, budesonida, ganciclovir entre outros (GUPTA et al., 2013). A seguir, alguns estudos ilustrarão a aplicabilidade das nanopartículas em medicamentos de uso oftálmico.

Fialho e Cunha Júnior (2007) apontam que os lipossomas possuem aplicabilidade para o tratamento de afecções oftálmicas, inclusive aquelas de difícil acesso farmacológico. Os autores mostram, inclusive, que medicamentos lipossomais para o tratamento de distúrbios do segmento posterior do olho já estão presentes no mercado. Devido à sua composição lipídica e seu reduzido tamanho de vesícula, os lipossomas possuem a capacidade de transpassar a barreira hematorretiniana, podendo ser administrados por via intravenosa e ainda assim alcançar níveis de biodisponibilidade ocular favoráveis à sua eficácia.

Dendrímeros são partículas poliméricas altamente ramificadas, que apresentam características favoráveis como forma bem definida, tamanho de partícula padronizado e

com baixo índice de polidispersão, presença de ramificações que permite o transporte de uma alta carga de fármaco, além de facilidade de transporte através de membranas. Kambhampati, e Kannan (2013) apontaram que essas partículas apresentam forte potencial de utilização tanto para a veiculação de moléculas sintéticas quanto de peptídeos, nos segmentos anterior, intermediário e posterior do olho, sendo assim consideradas entre as nanopartículas mais promissoras para o uso na via oftálmica.

Além das conhecidas propriedades de encapsulação e controle de liberação, as nanopartículas podem ser formuladas de formas a associar outras propriedades ao seu desempenho. Foi o que demonstrou estudo conduzido por Bhatta et al. (2012), no qual nanoesferas foram produzidas de maneira a encapsular satisfatoriamente o fármaco natamicina e exercer ação mucoadesiva, o que prolongou o tempo de permanência na mucosa oftálmica, sendo o sistema apontado como alternativa potencial para formulação de medicamentos para o tratamento de infecções oftálmicas.

Gupta et al., (2013a) utilizaram a nanotecnologia para aumentar o tempo de permanência precorneana da esparfloxacina. O fármaco foi incorporado em nanoesferas de poli-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), que por sua vez foram incorporados numa matriz mucoadesiva de quitosana. O uso de matrizes mucoadesivas, bastante aplicado a formas farmacêuticas administradas por via oral, nasal e vaginal se mostrou eficiente também para a formulação oftálmica, que teve seu tempo de permanência na mucosa oftálmica efetivamente prolongado. O mesmo grupo, ainda em 2013 (b), também demonstrou a aplicabilidade do sistema para a veiculação de levofloxacina.

O estudo de Jóhannesson et al. (2013) mostrou que as propriedades de carreamento dos fármacos dexametasona e dorzolamida por nanoesferas foram significativamente aumentadas quando estas foram produzidas à base de γ -ciclodextrina. Com o uso desse material, foi possível obter altas concentrações destes fármacos na mucosa oftálmica e por um intervalo de tempo superior ao medicamento de referência, ainda que o medicamento teste fosse aplicado topicamente sobre o olho.

Kalam et al. (2012) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) para veiculação de gatifloxacina, um agente antibacteriano sintético de amplo espectro, derivado do ácido nalidíxico. Este estudo demonstrou que a matriz lipídica das nanopartículas foi responsável pelo aumento na permeação corneana pelo fármaco. Além disso, a estearilamina apresentou capacidade de prolongar a retenção precorneal do fármaco, mantendo a absorção do fármaco por um maior período. SLNs carregadas

positivamente (catiônicas) também demonstraram maior permeabilidade, retenção e tolerabilidade de uso quando comparadas ao medicamento de referência.

Nanocristais são partículas nanométricas com arranjo molecular altamente organizado. São constituídos por uma partícula sólida de fármaco revestida por um material estabilizante que também impede a agregação das partículas. Semelhante a outros tipos de nanopartículas, os nanocristais também favorecem a solubilidade e a absorção de moléculas pouco solúveis, além de favorecer sua liberação controlada. No estudo de Tuomela et al. (2014), foram desenvolvidos nanocristais de brinzolamida para uso oftálmico no tratamento do glaucoma. Estes mostraram estabilidade e dissolução imediata, além de serem eficazes no modelo de estudo *in vivo* aplicado, quando comparados ao mesmo fármaco na forma comercial tradicional.

Nanopartículas foram desenvolvidas por Silva et al. (2013) a partir da associação de poliuretano com argila rica em óxido de alumínio. Estas partículas demonstraram potencial para o desenvolvimento de um substrato intraocular implantável, uma vez que favoreceram a adesão, proliferação e migração de uma linhagem de células do epitélio pigmentar da retina, sem a deflagração de processos inflamatórios. Os autores apontaram, portanto, o nanomaterial desenvolvido como um possível carreador em transplantes deste tipo de epitélio intraocular.

Em um outro estudo (SILVA et al., 2011), um sistema nanoparticulado de composição semelhante foi avaliado quando à capacidade de carreamento de acetato de dexametasona. Este nanomaterial mostrou-se não apenas capaz de carrear e liberar o fármaco em questão, mas também manter sua liberação por longos períodos (acima de 300 dias), sem apresentar sinais de efeitos tóxicos ou prejudicando a funcionalidade do epitélio pigmentar da retina.

Nanofibras são outra forma de nanomaterial que possui forte potencial de aplicação no campo da oftalmologia. Por propiciarem importante efeito funcional na matriz extracelular do tecido em que são aplicadas, apresentam a capacidade de dar suporte ao metabolismo normal das células ao mesmo tempo em que realizam a liberação de fármacos associados às partículas. Silva et al. (2015) estudaram a aplicabilidade de nanofibras de poli (ϵ -caprolactona) na oftalmologia, avaliando sua compatibilidade, e demonstrando que este nanomaterial foi considerado compatível com esta via de administração, conservando a funcionalidade das células e não provocando efeitos colaterais *in vivo*.

A nanotecnologia é uma aliada importante na terapêutica anti-VEGF, uma vez que apresenta as capacidades tanto de direcionar a liberação do fármaco, concentrando-o em seu sítio ativo, como também de melhorar sua biodisponibilidade e sua estabilidade. Apesar dos biofármacos utilizados na terapêutica frequentemente serem suscetíveis a degradação, métodos de produção de nanosistemas com estes têm sido desenvolvidos e demonstrado uma promissora aplicabilidade. A tecnologia de fluido supercrítico foi utilizada para produção de nanopartículas de PLGA contendo bevacizumabe utilizando dióxido de carbono supercrítico. Testes *in vitro* realizados com essas nanopartículas demonstraram que essas foram capazes de liberar o fármaco durante aproximadamente quatro meses. Testes *in vivo* com essas partículas mostraram que concentrações do fármaco no vítreo foram detectadas por um período de dois meses, enquanto a concentração do fármaco após injeção do Avastin® foi detectada por apenas duas semanas (LIN et al., 2015).

A preparação de sistemas nanoparticulados, pelos métodos de emulsificação convencionais, utilizando fármacos proteicos constantemente enfrenta o obstáculo de sua alta susceptibilidade à degradação por solventes orgânicos. Varshochian e colaboradores (2015) formularam nanopartículas de PLGA contendo bevacizumabe utilizando o método de emulsificação múltipla, que foram capazes de liberar o fármaco por um período superior a 8 semanas, demonstrando um aumento de cerca de 1,6 vezes no tempo de meia-vida do fármaco. Os autores relatam que a manutenção da concentração e da atividade do fármaco foi possível devido à utilização de albumina como estabilizador frente ao solvente diclorometano.

Nanopartículas de inorgânicas, como aquelas compostas por ligas de ouro e prata, semicondutores ou materiais ferromagnéticos, apresentam a vantagem de terem uma síntese facilitada, a partir da qual é possível ajustar e determinar diversas propriedades físico-químicas do material a ser obtido. Dessa forma, essas nanopartículas têm sido estudadas pelo seu potencial de carreamento de fármacos, e demonstrado importantes propriedades em meio biológico. Essas partículas, geralmente produzidas com diâmetro abaixo de 100 nanômetros, podem ser funcionalizadas com diversos tipos de materiais e biomoléculas em sua superfície, que conferem a essas uma importante propriedade de vetorização (SHEN et al., 2015).

As nanopartículas de ouro demonstraram capacidade de impedir a neovascularização ocular, mesmo na ausência de fármacos em sua superfície. Nanopartículas de sílica mesoporosa têm se mostrado potentes carreadores de fármacos

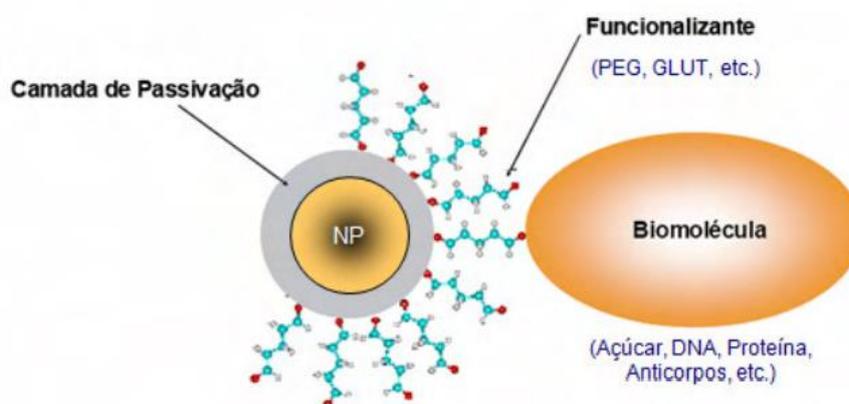
devido à sua estrutura porosa, grande área superficial e grande facilidade de funcionalização. Nanopartículas de prata também demonstraram importante capacidade de bloquear vias inflamatórias envolvidas no processo de neovascularização (SHEN et al., 2015).

2.4.1 Pontos quânticos

Pontos quânticos (PQs) são nanocristais de materiais semicondutores que possuem notáveis propriedades de absorção e emissão de energia. Esses monocristais são sintetizados tipicamente em tamanho entre 2 e 10 nm, e suas propriedades de emissão de radiação podem ser delineadas de acordo com sua composição química e tamanho de partícula. Os pontos quânticos apresentam amplo espectro de absorção, alto rendimento quântico, alta estabilidade a fotodegradação e *bleaching*, amplo deslocamento de Stokes (distanciamento espectral entre os máximos de absorção e de emissão) e uma superfície quimicamente ativa, o que abre espaço à sua aplicação em diversos campos da ciência. No campo da pesquisa biológica, o interesse por esse tipo de material cresceu por volta do ano de 1998, quando foram publicadas pesquisas utilizando pontos quânticos como marcadores fluorescentes para imagem (CUNHA et al., 2018; ZHAO et al., 2018; CARVALHO et al., 2019).

Estas nanopartículas tipicamente apresentam uma estrutura formada por material inorgânico recoberto por uma camada de material orgânico e ligantes ([Figura 06](#)). Além disso, os pontos quânticos costumam apresentar energias de banda proibida (energia entre a banda de valência e a banda de condução) menores do que 4,0 eV, e suas propriedades eletrônicas diferem fortemente de seus respectivos materiais massivos. A maioria dos pontos quânticos estudados são sistemas binários, denominados de acordo com as famílias dos elementos utilizados em sua constituição. Assim, alguns exemplos são os pontos quânticos II-VI (CdSe, CdS) e III-V (InAs, GaAs) (Girma et al., 2017; AMARAL-JÚNIOR et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Figura 06 – Estrutura típica de um ponto quântico e diversas modificações de superfície possíveis.



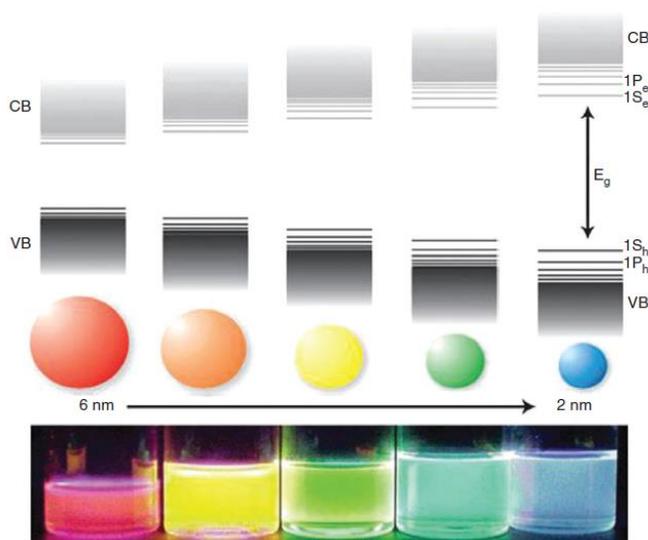
Fonte: Chaves, 2011.

As propriedades de emissão e absorção de energia dos pontos quânticos são devidas ao efeito de confinamento quântico que ocorre com a síntese desses materiais em tamanhos nanométricos. A princípio, a absorção de energia pelo material ocorre quando este absorve um fóton com maior energia que sua banda proibida. Com isso, o elétron excitado salta da banda de valência para a banda de condução, deixando para trás um buraco na banda de valência. A distância entre o elétron excitado na banda de condução e o buraco que este deixa na banda de valência é chamado de raio do éxciton de Bohr. A redução do tamanho de partículas, para dimensões comparáveis ao raio do éxciton de Bohr daquele material, causa uma alteração característica da sua banda proibida, que deixa de assumir valores contínuos e passa a assumir valores discretos. Assim, ocorre a modulação da energia dos fótons que serão emitidos por aquele material ([Figura 07](#)). De maneira geral, quanto menor a partícula, mais energéticos serão os fótons que serão emitidos por esta (MANSUR, 2010; GIRMA et al., 2017).

Uma vez que a fluorescência ocorre com a emissão de energia quando o elétron excitado retorna da banda de condução para a banda de valência, a energia fotônica e, portanto, o comprimento de onda de emissão dos pontos quânticos, pode ser ajustada de acordo com o seu tamanho de partículas, variando desde o infravermelho próximo até o ultravioleta. Esta possibilidade, juntamente com o baixo índice de polidispersão que a síntese pode fornecer, permite obter materiais com amplos espectros de absorção e ao mesmo tempo uma faixa estreita, simétrica e ajustável de emissão (ZHAO et al., 2018; AMARAL-JÚNIOR et al., 2021).

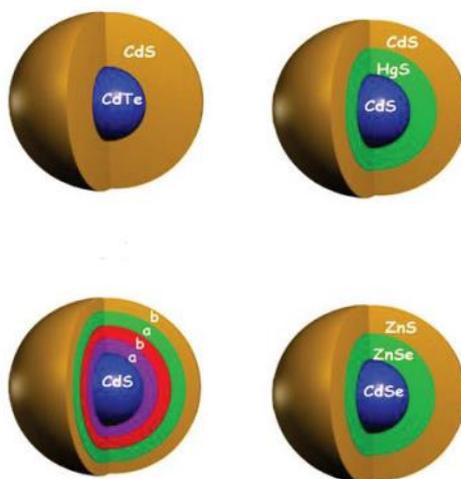
Devido à sua grande área superficial, os pontos quânticos costumam exibir numerosos defeitos em sua superfície, o que afeta diretamente sua propriedade de fotoluminescência. Para reduzir ou prevenir a perda dessa propriedade, algumas estratégias de passivação da superfície são utilizadas, sendo usual a adição de uma segunda camada semicondutora, de maior banda proibida, sobre os pontos quânticos (**Figura 08**) (MANSUR, 2010).

Figura 07 – Variação na emissão de fluorescência devido a modulação da energia de banda proibida com a variação do tamanho de pontos quânticos.



Fonte: Zhao et al., 2018.

Figura 08 – Esquema estrutural de um ponto quântico núcleo/casca.



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2010.

A síntese de pontos quânticos do tipo núcleo-casca geralmente ocorre em dois estágios, sendo o primeiro referente à formação do núcleo e o segundo referente à formação da casca na superfície do núcleo. Em sistemas coloidais, a primeira etapa ocorre com a união dos precursores inorgânicos no sistema com o estabilizador orgânico. Com sua dissolução, monômeros da liga semicondutora são formados e se precipitam espontaneamente na solução (nucleação). Em seguida, esses monômeros capturam os átomos semicondutores dissolvidos na solução e crescem até a completa depleção de monômeros (crescimento). Eventualmente, partículas grandes podem competir com os monômeros pequenos pelos átomos dissolvidos. Em um dado momento, as partículas pequenas podem começar a se dissolver e serem agregadas pelas partículas maiores - esse processo não é típico, mas pode gerar amostras polidispersas (MANSUR, 2010; GIRMA et al., 2017).

A síntese dos pontos quânticos pode ser conduzida em meio hidrofílico ou hidrofóbico. No geral, a síntese em meio orgânico possibilita a obtenção de amostras com maior capacidade de fluorescência (rendimento quântico), entretanto, com menor estabilidade coloidal em meio biológico. Dessa forma, para aplicação biomédica, é preferível a rota hidrofílica de síntese. Durante a síntese, é imprescindível a incorporação de agentes estabilizadores, que desempenham o papel de impedir aglomeração e a precipitação dos nanocristais durante o crescimento, além de limitar o tamanho que eles alcançam, e dessa forma, preservar as suas propriedades de emissão e polidispersão. Na síntese hidrofílica os principais estabilizadores utilizados são alquiltrióis, como o ácido mercaptosuccínico e a cisteamina, entretanto, esta rota também permite a estabilização com polímeros sintéticos e biopolímeros biocompatíveis e estáveis, o que representa um grande avanço na síntese de PQs para aplicações biológicas. (MANSUR et al., 2015; CUNHA et al., 2018).

2.4.2 Funcionalização de pontos quânticos

Pontos quânticos podem ser funcionalizados por meio da associação de ligantes como polímeros, proteínas, enzimas anticorpos e ácidos nucleicos, dentre outras moléculas, em sua superfície. Com isto, estas partículas se tornam capazes de interagir com sítios de interesse no organismo (como tecidos, células e receptores), exercendo uma ação localizada (MANSUR, MANSUR e GONZÁLEZ, 2011; CARVALHO et al., 2019).

Para permitir a conjugação dos pontos quânticos com ligantes de interesse, é fundamental a introdução, em sua superfície, de grupos funcionais capazes de mediar a ancoragem desses ligantes. Isto pode ser obtido na fase de síntese das partículas, com o uso de estabilizantes anfífilos que possuam esses grupos funcionais (SANTOS, MANSUR e MANSUR, 2013).

Para conferir direcionamento aos pontos quânticos, sua superfície costuma ser funcionalizada com diferentes moléculas de interesse, utilizando quatro principais estratégias: adsorção, interação eletrostática, ligação covalente, troca de estabilizadores e conjugação via streptavidina-biotina (CUNHA et al., 2018).

A conjugação por interações eletrostáticas ocorre pela interação entre grupos funcionais na superfície das partículas e grupos funcionais de carga oposta nas moléculas de interesse, sendo usada especialmente na conjugação de ligantes protéicos. Apesar da relativa simplicidade dessa abordagem, é importante ressaltar que esse processo não favorece um controle da orientação do ligante imobilizado, uma vez que depende do grau de ionização, presença de sítios concorrentes, força iônica do meio, entre outros, podendo inclusive chegar a modificar a conformação de ligantes protéicos (MANSUR, 2010; BILAN et al., 2015).

A via da avidina-biotina baseia-se na interação específica e de alta afinidade entre essas duas moléculas. Existem, no mercado, diversos tipos de biomoléculas e polímeros modificados com biotina e avidina (bem como streptavidina e neutravidina), que podem ser usados na superfície dos pontos quânticos, enquanto a molécula complementar da interação se encontra no ligante de interesse (a exemplo de enzimas biotiniladas). No caso da utilização desta via de bioconjugação, é importante observar o potencial de interferência da biotina endógena, comum em células de mamíferos, sobre a interação do ponto quântico com o ligante biotinilado (MARQUES, MANSUR e MANSUR, 2013; BILAN et al., 2015).

Pontos quânticos podem ainda ser funcionalizados pela conjugação de ligantes através de ligações covalentes. Para isto, o método mais utilizado é a ligação entre aminas primárias e grupos carboxílicos ativados por EDC (N-etil-N'-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida). Neste método, a partir da ativação dos grupos carboxila, formam-se intermediários O-acilissouréia instáveis, que são rapidamente hidrolisados em meio aquoso. Para evitar a perda desses grupos, os intermediários O-acilissouréia podem ser convertidos em ésteres N-hidroxisuccinimida, N-hidroxisuccinimida sulfonada ou ainda sulfofluorfenila, que são mais estáveis (MANSUR, 2010; BILAN et al., 2015).

Ao utilizar a formação de ligações covalentes para a conjugação de peptídeos à superfície dos pontos quânticos, é importante verificar que a presença de múltiplos sítios de ligação (grupos amina ou carboxila) pode desfavorecer sua orientação, com prejuízo à sua especificidade de ligação. Diante disto, a conjugação por meio de grupos tiol de biomoléculas é apontada como uma alternativa que propicia maior uniformidade de orientação de proteínas na superfície dos pontos quânticos. Nesta abordagem, as ligações dissulfeto de anticorpos são reduzidas por ditioneitol ou 2-mercaptoetilamina, e esses sítios então formam ligações com grupos maleimida, piridil dissulfeto ou iodacetil nos pontos quânticos (BILAN et al., 2015).

2.4.3 Aplicações dos pontos quânticos na terapêutica

No campo biomédico a principal aplicação dos pontos quânticos é como biossensores e marcadores fluorescentes. Pontos quânticos com propriedades de fluorescência são funcionalizados com moléculas biológicas de interesse, e estes associados a técnicas de imagem e imunohistoquímicas, permitem a marcação simultânea de diversas estruturas teciduais e sua observação ao mesmo tempo, uma vez que diferentes pontos quânticos podem absorver energia na mesma faixa espectral e emitir fluorescência em faixas espectrais distintas, sem que haja sobreposição de sinal. No caso do diagnóstico *in vivo*, os mais utilizados são pontos quânticos capazes de emitir energia na faixa do infravermelho próximo (NIR), uma vez que nesta faixa espectral a absorção e a interferência dos tecidos orgânicos são mínimas (PARK, JEONG e KIM, 2017; ZHAO et al., 2018; CAIRES et al., 2020).

A ampla área superficial dos pontos quânticos confere a estes a capacidade de incorporar e carregar uma grande quantidade de moléculas simultaneamente, e dadas as suas propriedades enquanto marcadores, estes se destacam como uma potencial ferramenta teranóstica, capaz de carrear fármacos ao mesmo tempo em que auxilia no diagnóstico e monitoramento da terapêutica. Estudos mostraram a eficiência dessas partículas no carreamento de fármacos utilizados na terapia anticâncer, como paclitaxel, doxorrubicina e 5-fluorouracil. Alguns autores reportam a utilização de pontos quânticos como agentes auxiliares na terapia fotodinâmica, associando a esses agentes um terceiro viés terapêutico, além do diagnóstico e do quimioterápico. De fato, o uso dos pontos quânticos na terapêutica do câncer tem destaque no contexto biológico (FREITAS et al., 2017; MATEA et al., 2017; ZHAO et al., 2018; SANTANA et al., 2019).

A toxicidade dos pontos quânticos pode estar relacionada a sua composição química, tanto orgânica quanto inorgânica, ao seu tamanho de partículas, funcionalização da superfície, carga, método de administração, via e dose administrada, biodistribuição e farmacocinética. Apesar de serem necessários estudos mais profundos, sabe-se que partículas menores do que 5 nm podem ser removidas através de *clearance* renal, enquanto partículas entre 10 e 20 nm podem ser eliminadas por via hepática e partículas superiores a 200 nm são filtradas pelo baço e pelo sistema retículoendotelial (GIRMA et al., 2017).

Um ponto importante para redução da toxicidade dos pontos quânticos, sobretudo aqueles que contêm em sua composição metais pesados como cádmio e mercúrio, está no seu revestimento e funcionalização. A presença de moléculas químicas compatíveis na sua superfície pode modular respostas celulares de fagocitose, ao mesmo tempo em que pode reduzir a possibilidade de liberação de íons tóxicos no organismo (MATEA et al., 2017).

Ao mesmo tempo em que carecem estudos sistemáticos e aprofundados relativos à toxicidade *in vivo* dos pontos quânticos, autores apostam na síntese desses materiais utilizando-se rotas ecologicamente corretas, como a aquosa, sem a utilização de solventes tóxicos, e com materiais que são conhecidamente biocompatíveis para o seu revestimento e funcionalização. Estes estudos têm obtido resultados promissores, com sistemas nanohíbridos capazes de marcar com sucesso diversas estruturas celulares e permitir sua observação por fluorescência, além de carrear com sucesso fármacos quimioterápicos e manter sua atividade frente as células tumorais *in vitro* (MANSUR et al., 2015; MANSUR et al., 2017; MANSUR et al., 2018).

Na área oftálmica, a aplicação dos pontos quânticos tem sido estudada com diversos intuitos, de acordo com suas propriedades. Olson et al. (2012) desenvolveram pontos quânticos capazes de emitir pulsos elétricos e avaliaram seu efeito neuroprotetor por meio da estimulação elétrica da retina em um modelo de degeneração. Este sistema se mostrou capaz de prolongar o tempo de sobrevivência dos fotorreceptores sem causar efeitos tóxicos, mantendo normal o registro eletrorretinográfico durante determinado período de tempo.

Yamamoto et al. (2007) utilizaram pontos quânticos fotoluminescentes para marcar o vítreo e, assim, detectar alterações como descolamentos ou liquefação. Os autores consideraram os PQs como marcadores mais eficientes para o vítreo do que as

substâncias fluorescentes utilizadas comercialmente, apontando estes como promissores no campo do diagnóstico oftalmológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar a segurança e a eficácia de pontos quânticos sintetizados por rota aquosa e estabilizados por biopolímero como carreadores de bevacizumabe para a retina, administrados por via intravítrea, no tratamento da neovascularização ocular.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar a produção de pontos quânticos CdS/ZnS e ZAIS
- Conjugar os pontos quânticos sintetizados ao anticorpo anti-VEGF bevacizumabe;
- Caracterizar os pontos quânticos quanto a:
 - Suas propriedades ópticas de absorção e emissão da radiação eletromagnética;
 - Seu raio hidrodinâmico e potencial de superfície;
 - Suas composições químicas;
 - Seu tamanho de partícula;
- Avaliar a atividade antiangiogênica dos pontos quânticos em modelo de membrana corioalantóica.
- Realizar a administração dos pontos quânticos em ratos por via intravítrea, e nestes avaliar:
 - A manutenção da função da retina das cobaias;
 - A segurança ocular quanto à manutenção da pressão intraocular;
 - A manutenção das características histológicas da retina das cobaias.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos pontos quânticos

A síntese e conjugação dos pontos quânticos foi realizada no Centro de Nanociência, Nanotecnologia e Inovação (CeNano²I) do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação do professor Dr. Herman Sander Mansur, utilizando metodologia previamente estabelecida pelo grupo (MANSUR et al., 2015).

4.1.1 Materiais

Nitrato de zinco hidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, > 99%), cloreto de zinco ($\geq 98\%$, ZnCl_2), nitrato de índio hidratado ($\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, In = 28,5% em peso), sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 98%), perclorato de cádmio hidratado ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), quitosana de baixa massa molecular (CHI, massa molecular MM = 50-190 kDa, grau de desacetilação DD = 96,1%) hidróxido de sódio (NaOH, 99%), cloridrato de N-etil-N'-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$), sal sódico de N-hidroxi-sulfossuccinimida (Sulfo-NHS, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$) e cloridrato de etanolamina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (EUA). Nitrato de prata (AgNO_3 , 99,9%) e ácido acético foram adquiridos da Synth (Brasil).

Os produtos químicos acima mencionados foram usados sem purificação adicional, água desionizada (água deionizada, Millipore SimplicityTM) com uma resistividade de 18,0 M Ω ·cm foi usada para preparar as soluções, e os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), a menos que especificado.

4.1.2 Síntese dos pontos quânticos ZAIS ($\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$)

Preparou-se uma solução de quitosana (1%, p/v) dispersando-se o pó em uma solução aquosa (2%, v/v) de ácido acético. A mistura foi colocada sob agitação constante *overnight* (à temperatura ambiente), até a solubilização completa (pH ~3,6). Os conjugados AgInS_2 (AIS) foram sintetizados através de uma via aquosa à temperatura ambiente como a seguir: 2 mL de solução de CHI e 48 mL de água deionizada foram adicionados a um frasco (pH = $4,0 \pm 0,2$). Sob agitação magnética, 0,33 mL da solução

precursora de prata (AgNO_3 , $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 1,33 mL de solução precursora de índio ($\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados ao frasco e agitados durante 1 min. Na sequência, sob agitação vigorosa, 2,0 mL da solução precursora de sulfeto ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados ao frasco de reação, em tipicamente 2-3 segundos. Em seguida, após 24 h, os núcleos AIS formados atuaram como sementes para o posterior crescimento da camada de ZnS, produzindo uma nanoestrutura de núcleo-casca (ZnS-AgInS_2), que foi submetida ao tratamento de anelamento térmico. Resumidamente, a camada de ZnS foi crescida pela adição de 1,25 mL de precursor de zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em 50 mL de dispersão AIS seguida por adição de 1,25 mL de precursor de sulfeto ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) da mesma forma, seguido de aquecimento a $100 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Todas as dispersões coloidais produzidas foram estáveis, homogêneas e amarelo-marrom claras e foram armazenadas à temperatura ambiente até utilização posterior.

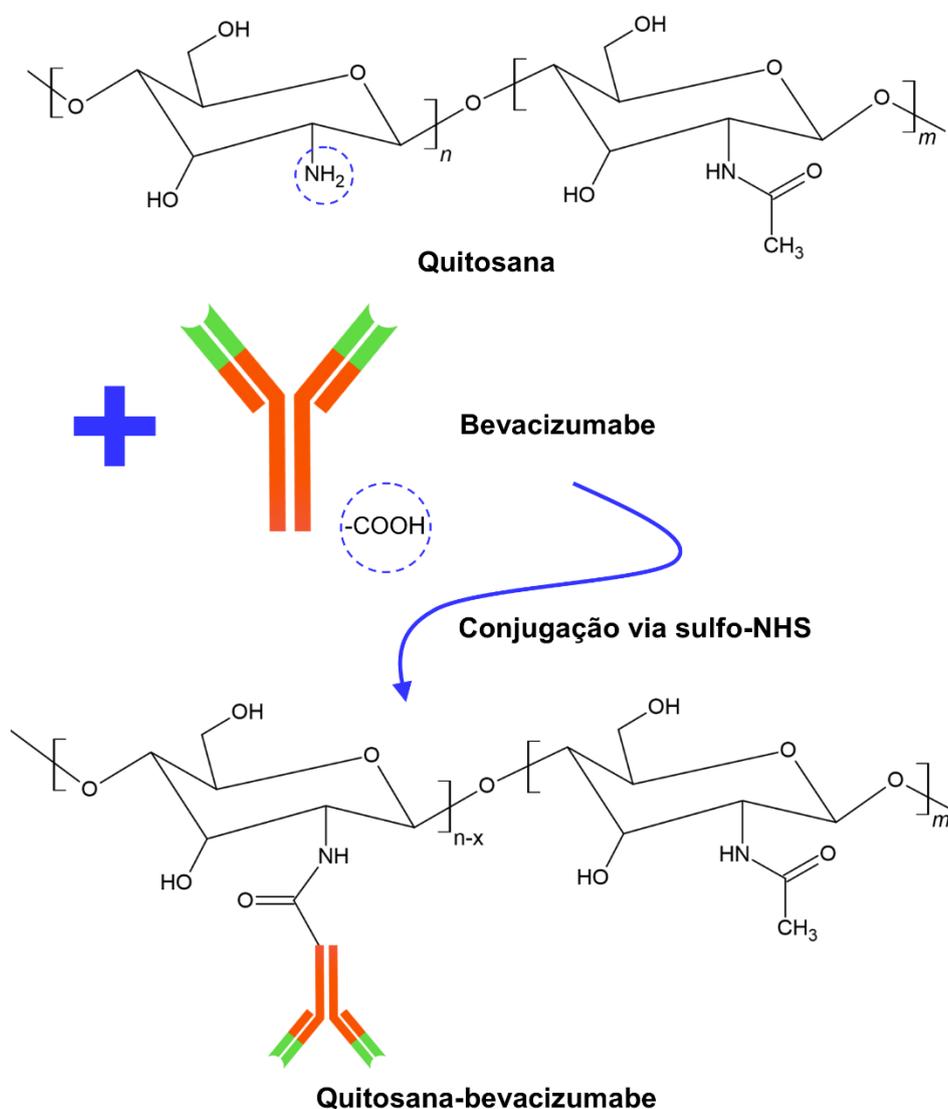
4.1.3 Síntese dos pontos quânticos CdS/ZnS

Os pontos quânticos de CdS foram sintetizados através de uma via aquosa à temperatura ambiente como a seguir: 2 mL de solução de CHI (como previamente preparada) e 40 mL de água deionizada foram adicionados a um frasco. O valor de pH desta solução foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Sob agitação magnética, 4,0 mL da solução precursora de cádmio ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 2,5 mL de solução precursora de zinco (ZnCl_2 , $0,8 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados ao frasco e agitados durante 3 min. A razão molar de Cd:S foi de 2:1. Após 24 h, uma casca de ZnS foi cultivada no núcleo de CdS formando uma nanoestrutura de núcleo-casca. Portanto, a suspensão coloidal de CdS foi refrigerada a 6 ± 2 por pelo menos 6 h. Então, a $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação, 1,25 mL de precursor de zinco (ZnCl_2 , $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foi depositado em gotas (10 μL a cada 10 s) em 50 mL da dispersão de CdS, seguida de adição de 1,50 mL de precursor de sulfeto ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) da mesma maneira (gota a gota, 10 μL a cada 10 s) e agitado por 20 min. Todas as dispersões coloidais de pontos quânticos produzidas foram estáveis, homogêneas e amareladas e foram armazenadas à temperatura ambiente até o uso posterior.

4.1.4 Bioconjugação do bevacizumabe aos pontos quânticos

O anticorpo bevacizumabe (Avastin[®], 25 mg mL⁻¹) foi bioconjugado nos pontos quânticos ZAIS e CdS/ZnS usando EDC como um agente de conjugação de "comprimento zero" na presença de sulfo-NHS. O EDC/sulfo-NHS converte os grupos carboxila no anticorpo em ésteres sulfo-NHS amina-reativos, que reagem com os grupos amina na quitosana, originando ligações amida covalentes estáveis, conforme esquematizado na **Figura 09**:

Figura 09 – Esquema da reação utilizada para conjugação do bevacizumabe à quitosana.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Antes da conjugação, o pH dos pontos quânticos ZAIS e CdS/ZnS foram medidos e ajustados para $6,0 \pm 0,1$ com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) se necessário. A conjugação de anticorpo aos pontos quânticos foi realizada como a seguir: 100 μL de solução de EDC (10 mg mL^{-1}) e 100 μL de solução de sulfo-NHS (25 mg mL^{-1}) foram adicionados ao balão de reação com 250 μL de solução de anticorpo (25 mg L^{-1}) e agitado magneticamente por 15 min a $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Sob agitação contínua, adicionaram-se 7,4 mL de suspensão de CdS/ZnS ou 8,0 mL de suspensão de ZAIS e o sistema foi incubado à temperatura ambiente durante 2 h no escuro. Em seguida, adicionou-se cloridrato de etanolamina ao frasco de reação e agitou-se magneticamente durante 15 min a uma concentração final de $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ para extinguir a reação. Os bioconjugados PQ-anticorpos foram dialisados por 24 h (com mudanças de água após 2 h e 4 h) contra 1 L de água destilada usando um Kit de Mega Diálise Pur-A-Lyzer™ (Sigma, membrana de celulose com filtro de corte de peso molecular, MWCO de 12.000 Da) à temperatura ambiente. Após a purificação, as dispersões de PQ-anticorpo foram armazenadas a $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ até uso posterior.

4.2 Amostras

As amostras estudadas nos experimentos de caracterização físico-química descritos a seguir foram:

- CdS/ZnS+: pontos quânticos de sulfeto de cádmio (CdS) com revestimento de sulfeto de zinco (ZnS) conjugados ao bevacizumabe (concentração de partículas $\approx 2,0 \text{ }\mu\text{M}$, concentração de anticorpo $0,735 \text{ mg mL}^{-1}$);
- CdS/ZnS-: pontos quânticos de sulfeto de cádmio (CdS) com revestimento de sulfeto de zinco (ZnS) não conjugados ao bevacizumabe (concentração de partículas $\approx 2,0 \text{ }\mu\text{M}$);
- ZAIS+: pontos quânticos de sulfeto de prata e índio (AgInS_2) com revestimento de sulfeto de zinco (ZnS) conjugados ao bevacizumabe (concentração de partículas $\approx 0,5 \text{ }\mu\text{M}$, concentração de anticorpo $0,735 \text{ mg mL}^{-1}$);

- ZAIS-: pontos quânticos de sulfeto de prata e índio (AgInS₂) com revestimento de sulfeto de zinco (ZnS) não conjugados ao bevacizumabe (concentração de partículas $\approx 0,5 \mu\text{M}$);

A concentração teórica de partículas foi determinada a partir da concentração inicial dos reagentes da síntese, composição do ponto quântico e seu tamanho, determinado por microscopia eletrônica de transmissão, considerando o volume final da suspensão após diálise e um rendimento de síntese de 90%.

Além destas, para os testes *in vivo*, duas outras amostras foram utilizadas:

- Bevacizumabe (controle positivo): solução de bevacizumabe preparada a partir do medicamento Avastin[®];
- PBS (controle negativo): tampão fosfato pH = 7,4.

4.3 Caracterização dos pontos quânticos

4.3.1 Espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis)

Realizaram-se medidas por espectroscopia ultravioleta-visível (Perkin-Elmer, Inc., EUA, equipamento Lambda EZ-210) em modo de transmissão com amostras colocadas em cubetas de quartzo, e varredura de visível para ultravioleta ($\lambda = 600$ a 190 nm). Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$), a menos que especificado de outra forma.

4.3.2 Espectroscopia de fotoluminescência (PL)

A espectroscopia de fotoluminescência dos conjugados foi realizada com base nos espectros adquiridos à temperatura ambiente usando FluoroMax-Plus-CP (Horiba Scientific), para obter varreduras de excitação/emissão em estado estacionário e 3D e mapeamento de contorno. O rendimento quântico de fotoluminescência (QY) de nanoconjugados de PQs foi adquirido de acordo com o procedimento convencional de método comparativo usando sulfato de quinina em H₂SO₄ (0,5 M, QY = 0,55, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) como padrão em excitação 350 nm.

4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros no infravermelho foram adquiridos pelo método de refletância total atenuada (ATR, Thermo Fischer, Nicolet 6700, Massachusetts, EUA) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe), na faixa de 4000 a 675 cm^{-1} usando 32 varreduras e a resolução de 4 cm^{-1} com subtração de fundo (replica, $n = 3$). As amostras foram preparadas colocando dispersões coloidais concentradas em pratos de plástico (moldes) e secas a 40 ± 1 °C por 24 h para a formação dos filmes antes da análise de FTIR.

4.3.4 Potencial zeta (ZP) e espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As caracterizações de espalhamento dinâmico de luz (também referido como espectroscopia de correlação de fótons) e potencial zeta foram realizadas usando o instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, luz laser de diodo vermelho de 35 mW, comprimento de onda $\lambda = 660$ nm), com pelo menos dez repetições ($n \geq 10$). As medidas foram realizadas à temperatura de $25,0 \pm 2$ °C, utilizando o método da equação de Smoluchowski, com um mínimo de dez repetições.

4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A caracterização morfológica das nanoestruturas de PQs foi realizada utilizando microscopia eletrônica de transmissão (Tecnai G2-20-FEI (FEI Company, EUA), a uma voltagem de aceleração de 200 kV, para a aquisição de imagens e espectros de energia dispersiva de raios-x (EDX). Antes da análise do MET, as amostras foram preparadas colocando gotículas de suspensão PQs diluídas em redes de cobre revestidas com carbono (Electron Microscopy Sciences, EUA) e secando à temperatura ambiente *overnight*. Os dados médios de tamanho e distribuição foram obtidos usando imagens MET medindo pelo menos 100 PQs selecionados aleatoriamente com base no programa de processamento de imagem (DigitalMicrograph®). Para esta análise, foram utilizadas apenas as amostras de pontos quânticos não conjugados ao bevacizumabe, uma vez que não é esperado que haja alteração de tamanho de partículas pelo processo de conjugação.

4.4 Avaliação da atividade antiangiogênica

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada utilizando o modelo de membrana corioalantóica (CAM) de embrião de galinha (*Gallus domesticus*), descrito por Soares et al. (2017) e Toledo et al. (2019). Neste ensaio, 15 ovos fertilizados foram utilizados para cada grupo experimental, mantidos em incubadora à temperatura de 37 °C e umidade de 60%.

No terceiro dia após a fertilização, um orifício de cerca de 1 cm de diâmetro foi feito na casca dos ovos, na região da câmara de ar, e com o uso de uma pinça, a membrana interior foi removida com o auxílio da adição de 100 µL de PBS estéril, para expor a membrana corioalantóica. Os orifícios foram fechados com fita adesiva.

Após 48 horas, no quinto dia de desenvolvimento do embrião, as fitas foram cuidadosamente removidas e 50 µL de cada amostra foram aplicados sobre a CAM, em local padronizado. Os ovos foram novamente fechados e incubados. Após 24 horas, a administração das amostras foi repetida, no mesmo local, em cada ovo. Os ovos foram novamente fechados e incubados. Neste teste, todas as amostras foram preparadas na concentração equivalente a 500 µg mL⁻¹ de bevacizumabe.

Passadas mais 24 horas, as membranas foram expostas e fixadas com uma solução de formaldeído a 10% durante 10 minutos. As membranas foram retiradas e dispostas em placas de Petri, e analisadas com um estereomicroscópio ligado a uma câmera digital. As imagens foram convertidas a escala de cinza utilizando o software ImageJ 1.51k e, em seguida, o software AngioTool foi utilizado para avaliar os parâmetros de área total vascularizada, comprimento total dos vasos, número de junções e lacunaridade dos campos fotografados.

4.5 Grupos de animais e administração das amostras

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em acordo com as normas da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO) para o uso de animais em pesquisa em visão e oftalmologia. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 30/2019).

Ratos Wistar albinos machos adultos, pesando cerca de 200 g, foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob condições controladas de luz (ciclo claro-escuro 12h/12h) e de temperatura (27 ± 1 °C), com acesso livre a água e alimento.

Três ratos foram aleatoriamente colocados em cada grupo experimental, divididos de acordo com a amostra a ser recebida por via intravítrea. Inicialmente, os ratos foram anestesiados utilizando uma injeção intraperitoneal contendo 90 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina. Os olhos foram anestesiados topicamente com um colírio tópico contendo 0,5% de proximetacaína.

A injeção intravítrea foi realizada utilizando uma seringa de 300 µL com agulha de 30 gauge, que foi inserida a cerca de 2 mm posteriormente ao limbo, e 0,05 ml das amostras foram lentamente injetados no olho direito de cada animal. A amostra PBS estéril foi injetada no olho esquerdo dos animais e utilizada como controle. Para este procedimento, todas as amostras foram preparadas na concentração equivalente a 500 µg mL⁻¹ de bevacizumabe.

A eutanásia dos animais foi realizada após 30 dias, através da administração intraperitoneal de uma injeção contendo 270 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina.

4.6 Eletrorretinografia (ERG)

Inicialmente, após a anestesia sistêmica e tópica, conforme procedimento descrito no item anterior, a pressão intraocular (PIO) dos animais foi aferida utilizando um tonômetro veterinário (Tono-Pen Vet[®], Reichert), com as medidas sendo registradas em mmHg.

A eletrorretinografia de campo total foi realizada nos dias 7, 14, 21 e 28 após a administração das amostras por via intravítrea. As respostas do eletrorretinograma foram adquiridas utilizando um eletrodo bipolar (lente de contato) colocado sobre a córnea. Dois eletrodos-agulha foram colocados na porção frontal do crânio e um eletrodo-agulha de referência foi colocado no dorso do animal. O estímulo luminoso foi realizado por um estimulador Ganzfeld posicionado dentro de uma gaiola de Faraday e controlado por um sistema computadorizado.

O experimento foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pela Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV), segundo o qual os animais foram previamente adaptados ao escuro por um período de 12 horas e em seguida

foram anestesiados topicamente e sistemicamente. As pupilas foram dilatadas com colírio contendo 0,5% de tropicamida.

Em seguida, flashes de luz branca (6500 K) com duração de 4 ms foram emitidos numa sequência de 11 passos: 0,00003, 0,0001, 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 cd.s.m⁻². Dois passos desta sequência foram tomados para análise no presente trabalho: o estímulo escotópico de 0,01 cd.s.m⁻², para avaliar a resposta de bastonetes, e o estímulo de 3,0 cd.s.m⁻², para analisar a resposta combinada de bastonetes e cones.

Os eletrorretinogramas foram avaliados com base na medida da amplitude das ondas A e B e dos tempos implícitos de registro das ondas A e B. As amplitudes e tempos implícitos foram comparados entre os grupos para verificação de possíveis variações significativas.

Foi estabelecida a relação matemática de quociente entre a amplitude da onda B e a amplitude da onda A registradas frente ao estímulo de 3,0 cd.s.m⁻² de acordo com a seguinte relação (**Equação 01**) (Hobot-Wilner et al., 2017):

$$\text{Relação } B/A = \frac{\text{amplitude da onda B (nV)}}{\text{amplitude da onda A (nV)}} \quad \text{Equação 01}$$

Em um segundo momento, a amplitude da onda B foi plotada em função do logaritmo do estímulo luminoso de cada passo do eletrorretinograma. Esse gráfico foi ajustado em um modelo hiperbólico de dose-resposta, de acordo com a seguinte relação (**Equação 02**):

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{I^n}{I^n + K^n} \quad \text{Equação 02}$$

Em que V é a amplitude registrada pelo eletrorretinograma frente a um estímulo de intensidade I, V_{max} é a amplitude máxima registrada, K corresponde ao estímulo capaz de retornar uma resposta de amplitude relativa a 50% da amplitude máxima (constante de semissaturação) e n é a constante geral de ganho (Hobot-Wilner et al., 2017).

Um filtro passa-banda foi aplicado ao braço ascendente da onda B para isolar os potenciais oscilatórios registrados com o estímulo de 3,0 cd.s.m⁻². A partir desses dados, as ondas P1, P2, P3 e P4 foram analisadas quanto às suas amplitudes e tempo implícito de registro (sendo P3 a maior onda, P1 e P2 as duas ondas previamente registradas e P4

a última onda registrada). Suas amplitudes foram traçadas como gráficos de função do tempo, a partir dos quais as áreas sob as curvas foram calculadas para comparação da resposta de sensibilidade global.

4.7 Avaliação histológica

Dois dias após a realização do último eletrorretinograma, os animais foram eutanasiados e os olhos enucleados para a preparação de amostras histológicas, segundo o método descrito por Toledo et al. (2019).

Os olhos enucleados foram fixados em solução de Davidson (etanol, formaldeído, ácido acético e água, 33,0:22,0:11,5:33,5) durante 24 horas. Em seguida, foram desidratados utilizando concentrações crescentes de xileno e incluídos em parafina. Os olhos foram seccionados próximo ao nervo óptico para a confecção de lâminas histológicas. As lâminas foram então coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico.

As imagens obtidas foram utilizadas para análise morfométrica, na qual foram medidas as espessuras das camadas plexiformes interna e externa da retina, as espessuras das camadas nucleares interna e externa e a espessura da camada de fotorreceptores. Os pontos de medida foram estabelecidos no segmento posterior do olho, em torno do nervo óptico, com espaçamento de 200 μm entre si. Pelo menos 50 pontos de cada amostra foram avaliados para estabelecer a espessura de cada camada.

Áreas quadradas padronizadas de 30x30 μm , separadas por uma distância de 200 μm entre si, foram selecionadas na camada nuclear externa para contagem de células e medida da área individual das células. Pelo menos 20 medidas de cada amostra foram utilizadas para calcular a densidade da camada nuclear externa e a área de suas células. Todas as medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ 1.51k.

Cortes de tecido ocular foram analisados por TUNEL para verificar a presença de apoptose. Para isso, os olhos foram fixados em paraformaldeído por 24 horas e em seguida lavados com PBS. Os olhos foram então imersos em soluções de sacarose em concentrações crescentes (20 e 40%) para crioproteção. Essas amostras foram lavadas e armazenadas a -80 °C em composto de temperatura de corte ideal (OCT) (Tissue-Plus[®], Fisher Healthcare). Cortes histológicos foram obtidos em criostato e dispostos em lâminas. Essas seções foram tratadas com um kit TUNEL (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas também receberam DAPI como contracorante. As

lâminas foram então observadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 880) com laser de excitação de 405 nm e detector ajustado em 440-480 nm para DAPI e 540-580 nm para TUNEL.

4.8 Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada com pós-teste de Tukey para verificar a ocorrência de diferenças significantes ($\alpha = 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.04. Para medidas feitas *in vivo* durante o período de estudo, as médias de cada dia de análise foram comparadas intra-dia (entre as amostras no mesmo dia) e inter-dia (entre os valores verificados para a mesma amostra em todos os dias de análise).

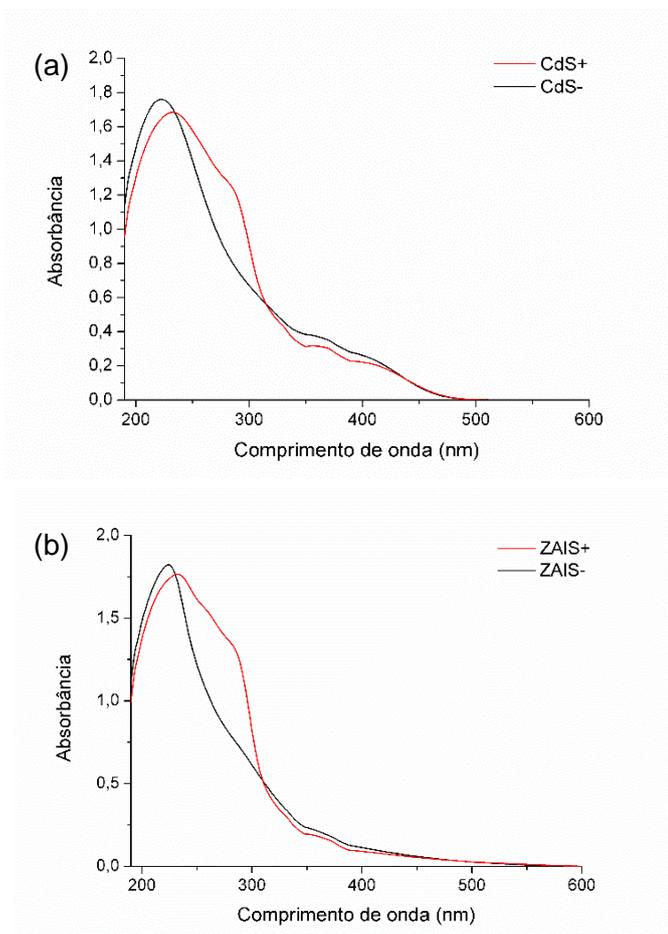
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização óptica e físico-química

5.1.1 Espectrofotometria na região do UV-Visível

A **Figura 10** apresenta os espectros de absorção das amostras. As amostras CdS/ZnS (**Figura 10a**) apresentaram um largo espectro de absorção, como é característico dos pontos quânticos, entre 190 e cerca de 489 nm, com máximo de 222 nm para CdS/ZnS- e 234 nm para CdS/ZnS+. Os espectros de absorção dos pontos quânticos ZAIS (**Figura 10b**) foram registrados entre 190 e cerca de 550 nm, com máximo de 224 nm para ZAIS- e 232 nm para ZAIS+.

Figura 10 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras CdS/ZnS (a) e ZAIS (b).



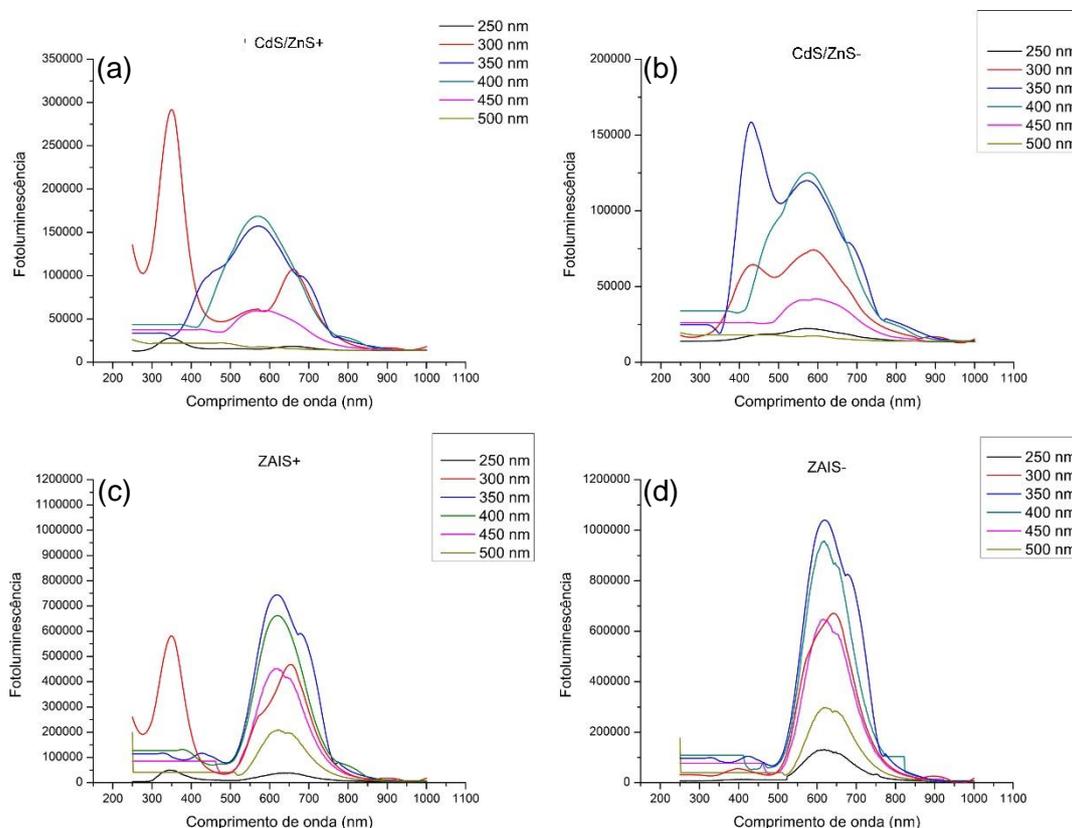
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Espectro de fotoluminescência

Os espectros de emissão referentes às amostras estão apresentados na **Figura 11**. Na **Figura 12** são apresentados os espectros de emissão tridimensionais, com o comprimento de onda de emissão no eixo x e o comprimento de onda de excitação no eixo y.

O máximo de emissão dos pontos quânticos CdS/ZnS+ (**Figura 11a**) no espectro visível foi registrado em 574 nm (filtro de excitação 400 nm), entretanto, é importante ressaltar que essa amostra também apresentou emissão no ultravioleta, com máximo em 345 nm, (filtro de excitação 300 nm). A amostra CdS/ZnS- (**Figura 11b**) também apresentou dois máximos de emissão, em 437 nm (filtro de excitação de 350 nm) e em 587 nm (filtro de excitação de 400 nm). O rendimento quântico da amostra CdS/ZnS- foi de 0,4% e o da amostra CdS/ZnS+ foi de 0,5%.

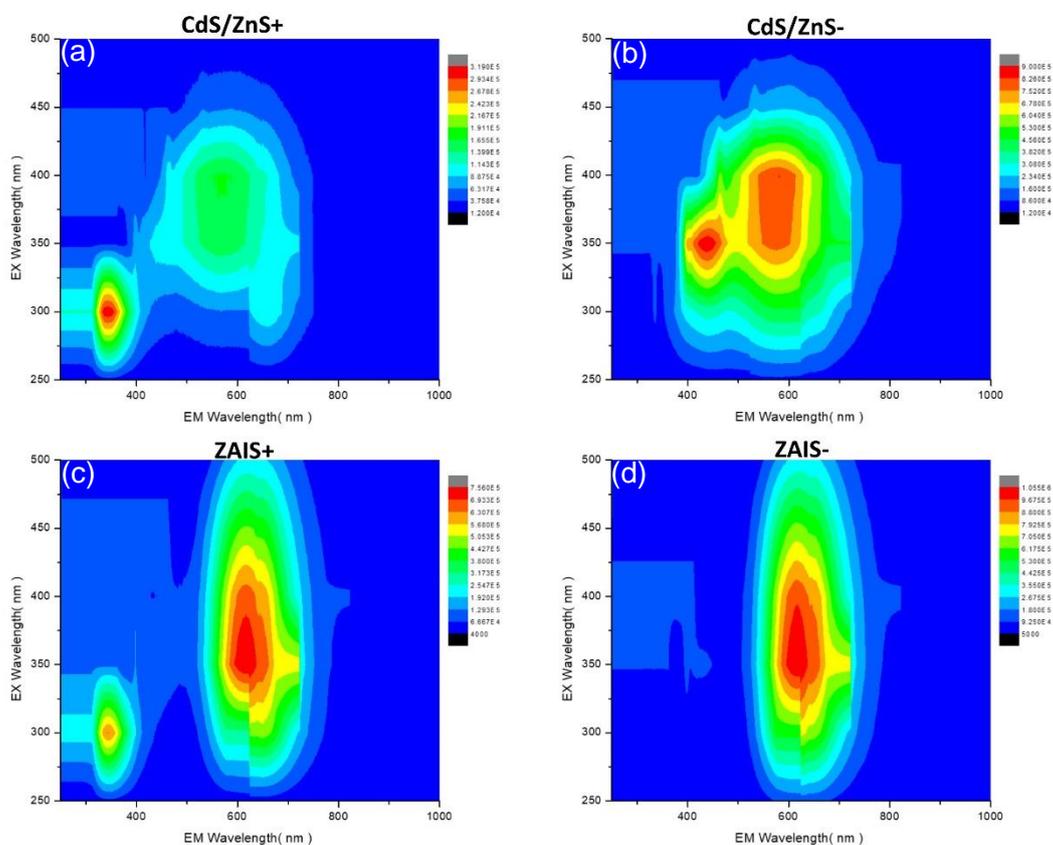
Figura 11 – Espectros de emissão das amostras CdS/ZnS (a e b) e ZAIS (c e d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra ZAIS+ (**Figura 11c**), por sua vez, apresentou dois máximos de emissão, em 343 e 615 nm, quando excitada com os filtros de 300 e 350 nm, respectivamente. A amostra ZAIS- (**Figura 11d**) apresentou apenas um máximo de emissão, em 617 nm, relativo ao filtro de excitação de 350 nm. O rendimento quântico da amostra ZAIS- foi de 5,0%, caindo para 3,0% após a conjugação ao anticorpo.

Figura 12 – Espectros de emissão tridimensionais das amostras CdS/ZnS (a e b) e ZAIS (c e d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico

A medida do potencial zeta indicou que as partículas apresentaram potencial positivo em sua superfície, inclusive após a conjugação ao anticorpo. Os diâmetros

hidrodinâmicos das partículas variaram com o processo de conjugação. Os valores encontrados de potencial zeta e de diâmetro hidrodinâmico estão dispostos na **Tabela 01**.

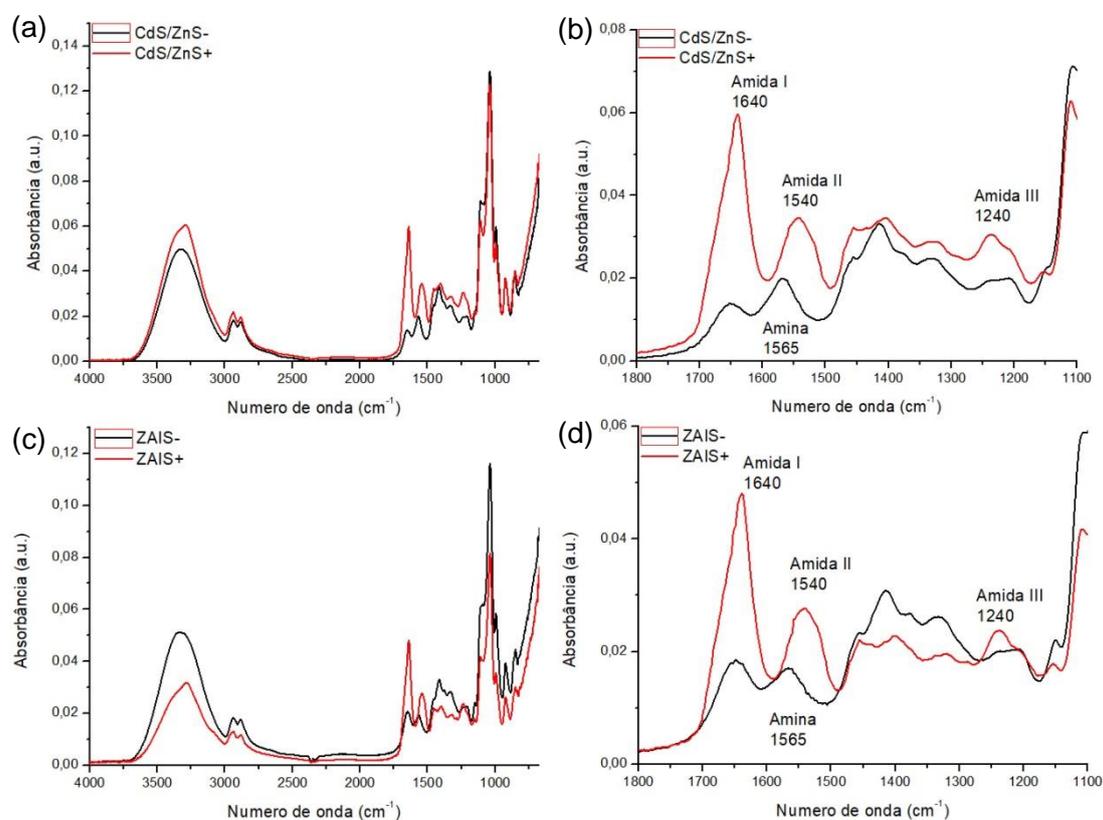
Tabela 01 – Valores obtidos de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das amostras.

Parâmetro	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-
Potencial zeta (mV)	+ 16,3 ± 1,4	+ 29,2 ± 7,1	+ 25,7 ± 0,9	+ 36,9 ± 1,6
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	37,7 ± 16,8	22,3 ± 0,6	75,1 ± 4,6	90,2 ± 12,8

5.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para verificar a ocorrência da conjugação do bevacizumabe à quitosana. A **Figura 13** apresenta os espectros referentes às quatro amostras (a e c), com ampliação da faixa entre 1800 e 1100 cm^{-1} (b e d) para a visualização das bandas referentes à ligação amida.

Figura 13 – Espectros na região do infravermelho para as amostras avaliadas.

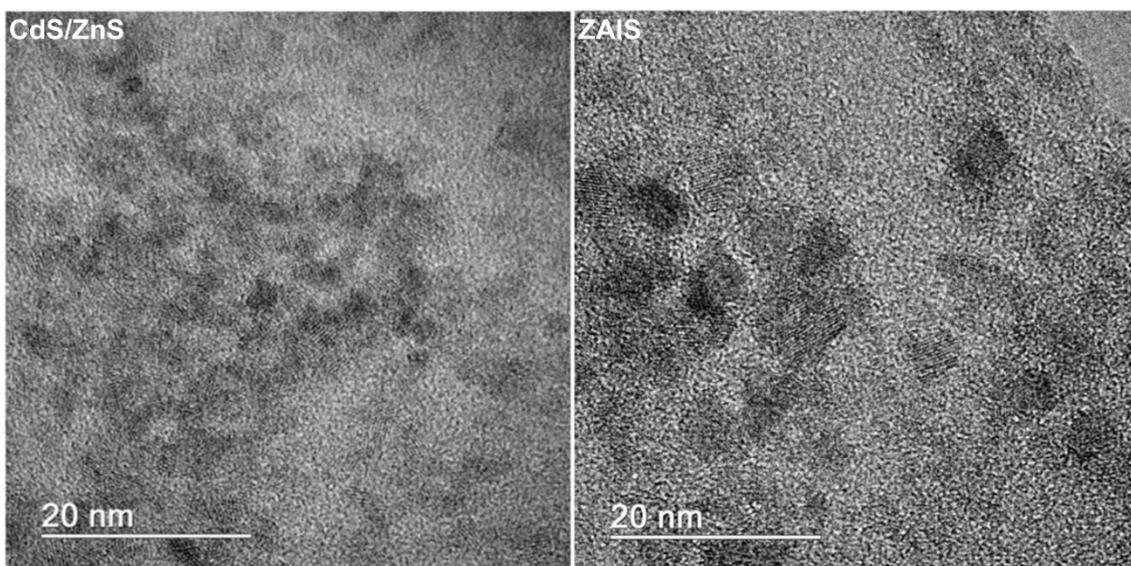


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão

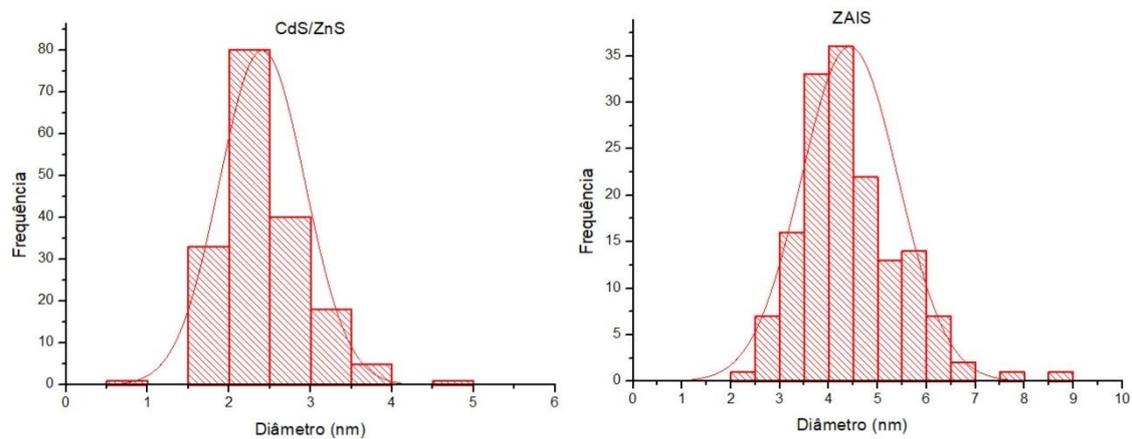
A microscopia eletrônica de transmissão é a técnica de escolha na caracterização de pontos quânticos por sua alta resolução, que permite visualizar os nanocristais de tamanho reduzido, e por permitir a identificação de sua estrutura cristalina e sua configuração núcleo/casca. Imagens representativas da microscopia estão dispostas na **Figura 14**.

Figura 14 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

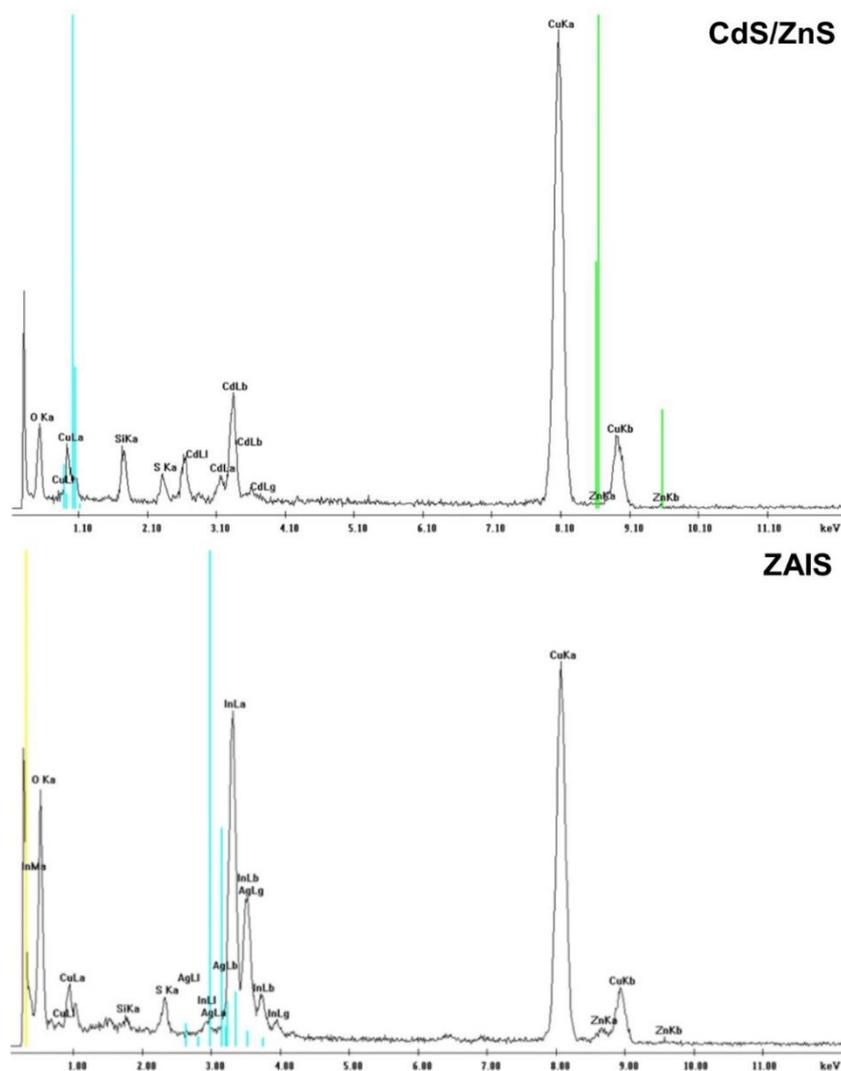
A análise de distribuição de tamanho de partículas, mostrada na **Figura 15**, indica que as amostras foram obtidas com baixa polidispersão e em tamanho reduzido, conforme o que é esperado para esse tipo de material. O diâmetro médio encontrado para as amostras CdS/ZnS- foi de $2,4 \pm 0,5$ nm, enquanto para as amostras ZAIS- foi de $4,4 \pm 1,0$ nm.

Figura 15 – Distribuição dos tamanhos de partícula encontrados na análise por MET,

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de energia dispersiva de raios-x estão dispostos na **Figura 16**, e apresentam bandas características dos elementos que compõem os nanocristais: zinco, cádmio, enxofre, índio e prata.

Figura 16 – Espectros de energia dispersiva de raios-x para as amostras.



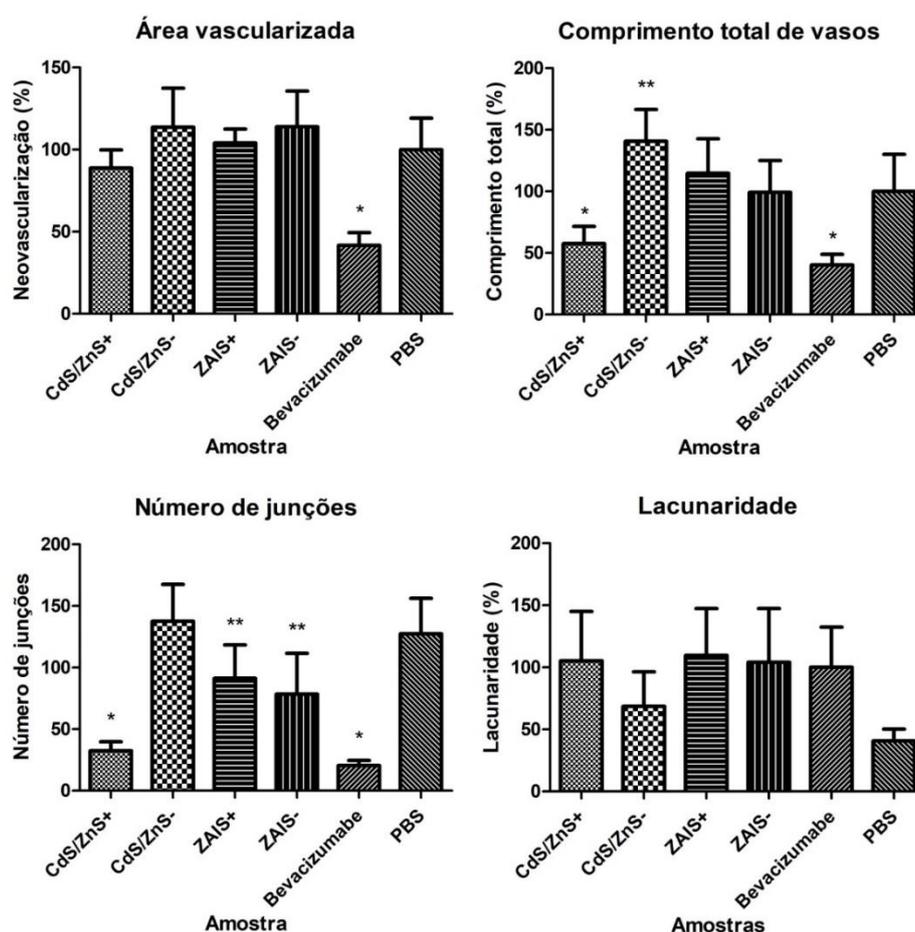
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Análise da atividade antiangiogênica

O modelo de membrana corioalantóica (CAM) foi utilizado para avaliação da atividade antiangiogênica por se tratar de um modelo apontado por diversos autores por sua forte correlação com a neovascularização *in vivo*. A partir das imagens obtidas, foi

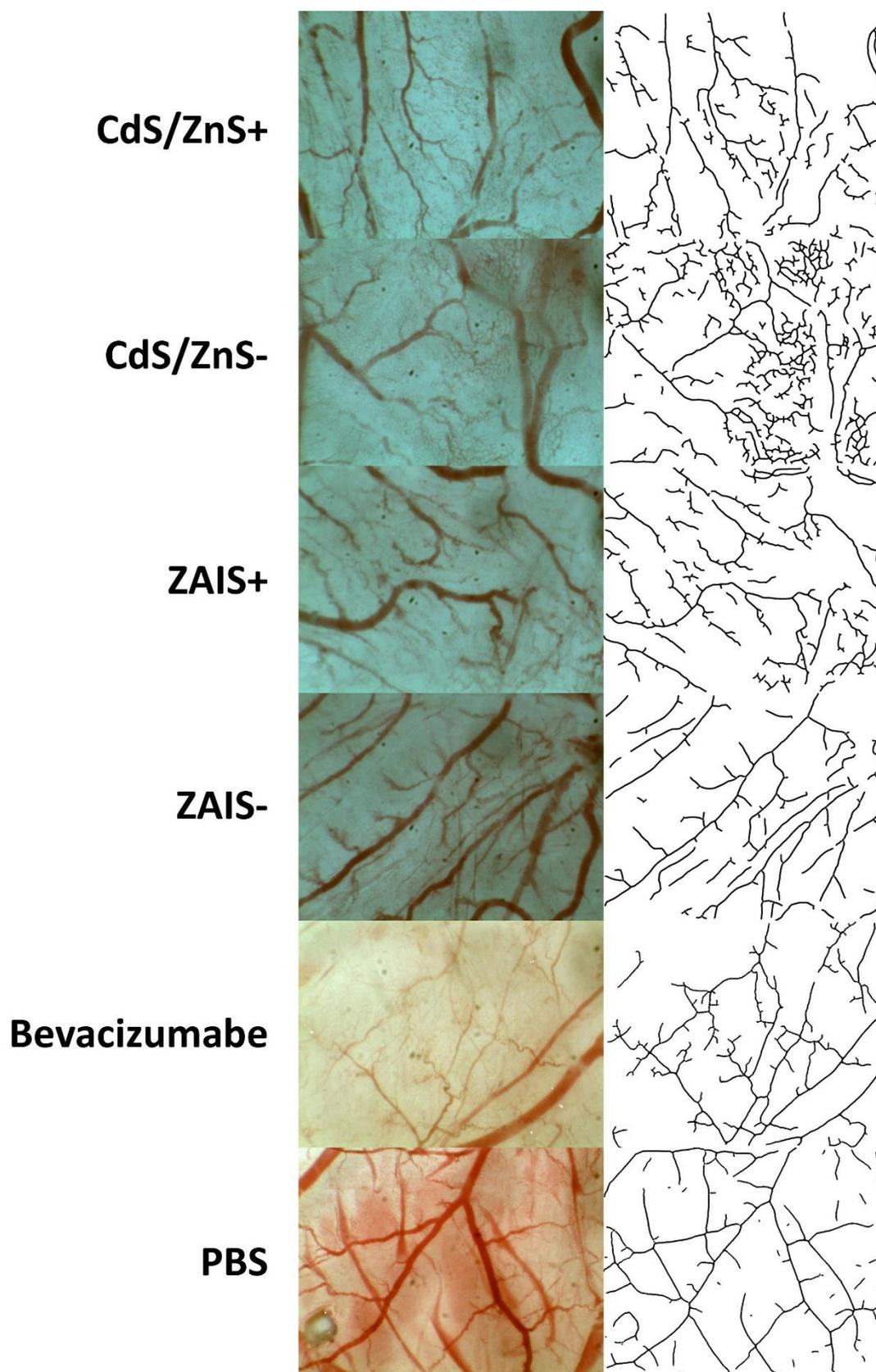
possível realizar a medida de quatro parâmetros da vasculatura corioalantóica, sendo a área vascularizada correspondente à área total ocupada pelos vasos nos campos analisados, levando em consideração diâmetro e comprimento, o comprimento total dos vasos correspondente ao somatório da extensão linear dos vasos, o número de junções correspondente ao número de pontos de bifurcação da vasculatura e a lacunaridade à relação de espaços não ocupados por vasos nos campos avaliados. Os parâmetros estão dispostos na **Figura 17** e imagens representativas das amostras avaliadas estão dispostas na **Figura 18**.

Figura 17 – Comparação dos parâmetros avaliados na vasculatura corioalantóica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Imagens representativas das amostras avaliadas no modelo de CAM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Eletrorretinografia

A eletrorretinografia foi empregada durante um período de 28 dias após a administração das amostras para avaliar possíveis alterações do funcionamento da função visual nos animais, mediante o monitoramento do comportamento eletrofisiológico da retina. O eletrorretinograma é um exame que fornece uma grande quantidade de informações a respeito da função visual no momento, bem como suas tendências de alteração no futuro. Neste trabalho, os dados de eletrorretinografia foram utilizados para investigar alterações na resposta da retina nos tempos avaliados, a ocorrência de possíveis lesões na retina e sua possível localização, e a manutenção da sensibilidade da retina aos estímulos luminosos.

A sequência de passos utilizada na eletrorretinografia consiste em uma série de estímulos luminosos de intensidades crescentes, em 11 níveis. Dessa forma, é possível verificar gradativamente a resposta eletrofisiológica da retina a essas intensidades crescentes de luz, desde a ausência de resposta no primeiro passo até a saturação completa da resposta da retina no décimo primeiro passo. Para as análises, foram utilizados os dados obtidos na etapa mediana da sequência, o passo 06 (estímulo de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$) e no último passo, o passo 11 (estímulo de $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$).

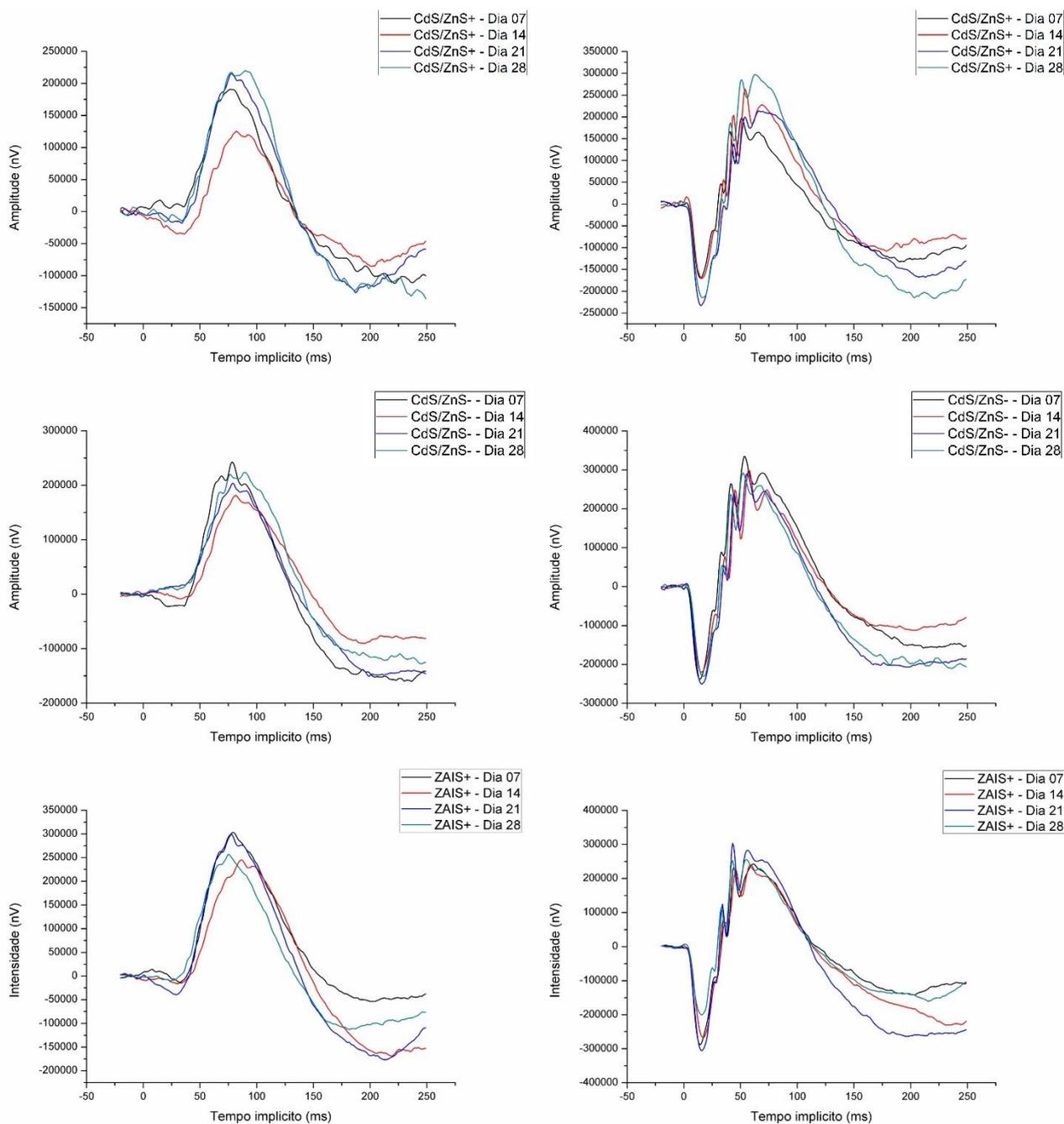
5.3.1 Eletrorretinogramas

As **Figuras 19** e **20**, apresentadas a seguir, mostram os perfis eletrorretinográficos obtidos para as seis amostras estudadas nos quatro tempos avaliados. À esquerda estão dispostos os eletrorretinogramas referentes ao passo 06 e à direita estão dispostos os eletrorretinogramas referentes ao passo 11. A curva relativa a cada dia de avaliação consiste na média dos perfis eletrorretinográficos dos animais avaliados naquele dia.

Em um eletrorretinograma típico, são apresentadas duas ondas de maior intensidade. A primeira, denominada onda A, é uma resposta de hiperpolarização, que alcança valores negativos do perfil registrado. Por ser registrada apenas frente a estímulos visuais mais intensos, esta está presente apenas nos perfis do passo 11, com sua amplitude máxima registrado em valores negativos. A onda B, por sua vez, indica uma resposta de despolarização e, portanto, é registrada em valores positivos no perfil eletrorretinográfico.

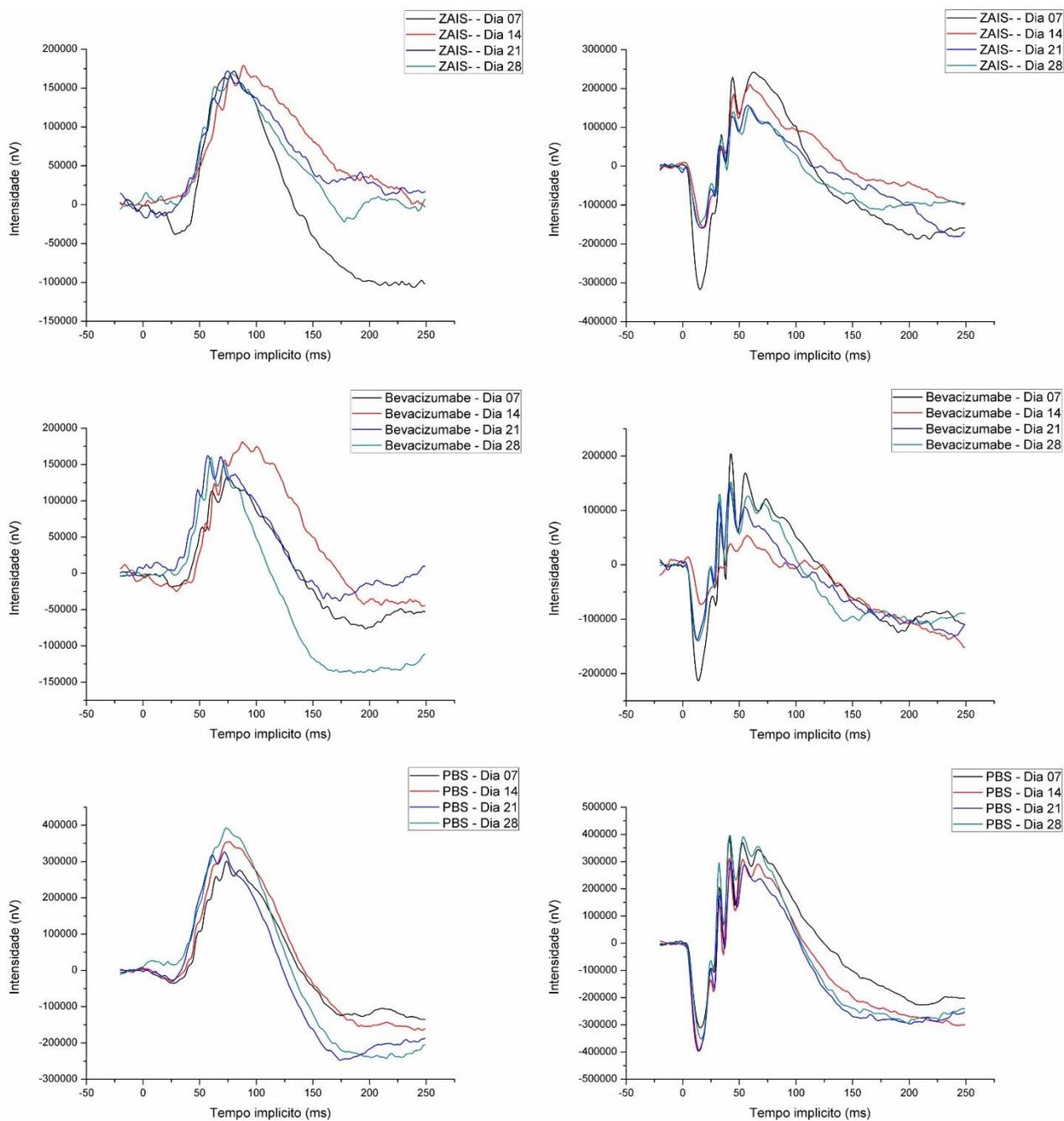
A onda B pode ser visualizada tanto nos perfis do Passo 6 quanto do passo 11, com sua amplitude máxima registrada em valores positivos (FISHMAN et al., 2001).

Figura 19 – Perfis eletrorretinográficos referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Perfis eletroretinográficos referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).

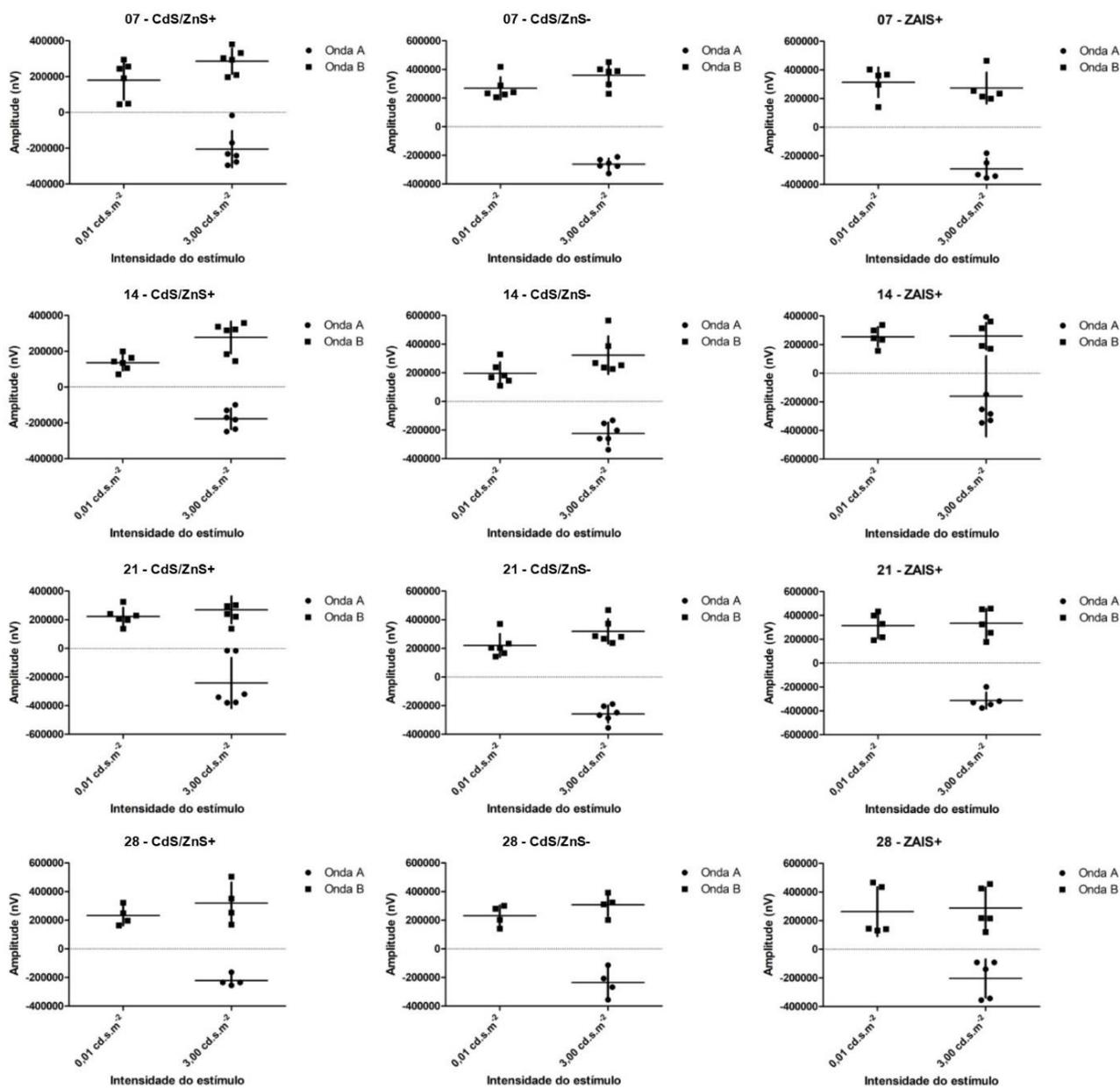


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores relativos às amplitudes das ondas A e B e os seus tempos implícitos de registro estão dispostos na **Tabela 02** e nas figuras **21**, **22**, **23** e **24**. A análise de

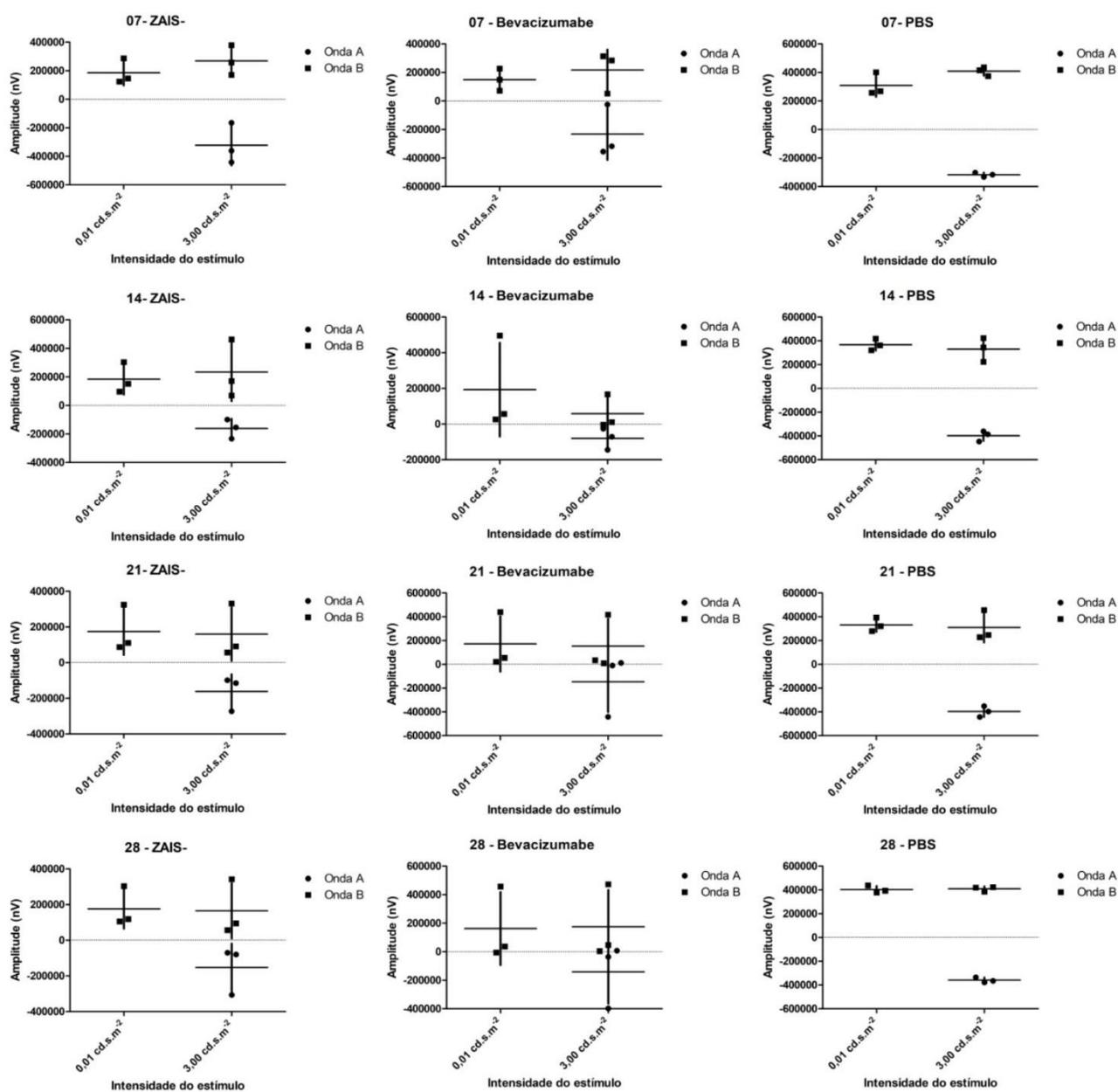
variância aplicada a esses dados não detectou diferenças estatísticas para $\alpha = 0,05$ entre nenhum dos dias de avaliação e entre em nenhuma das análises das amostras estudadas.

Figura 21 – Amplitudes das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.



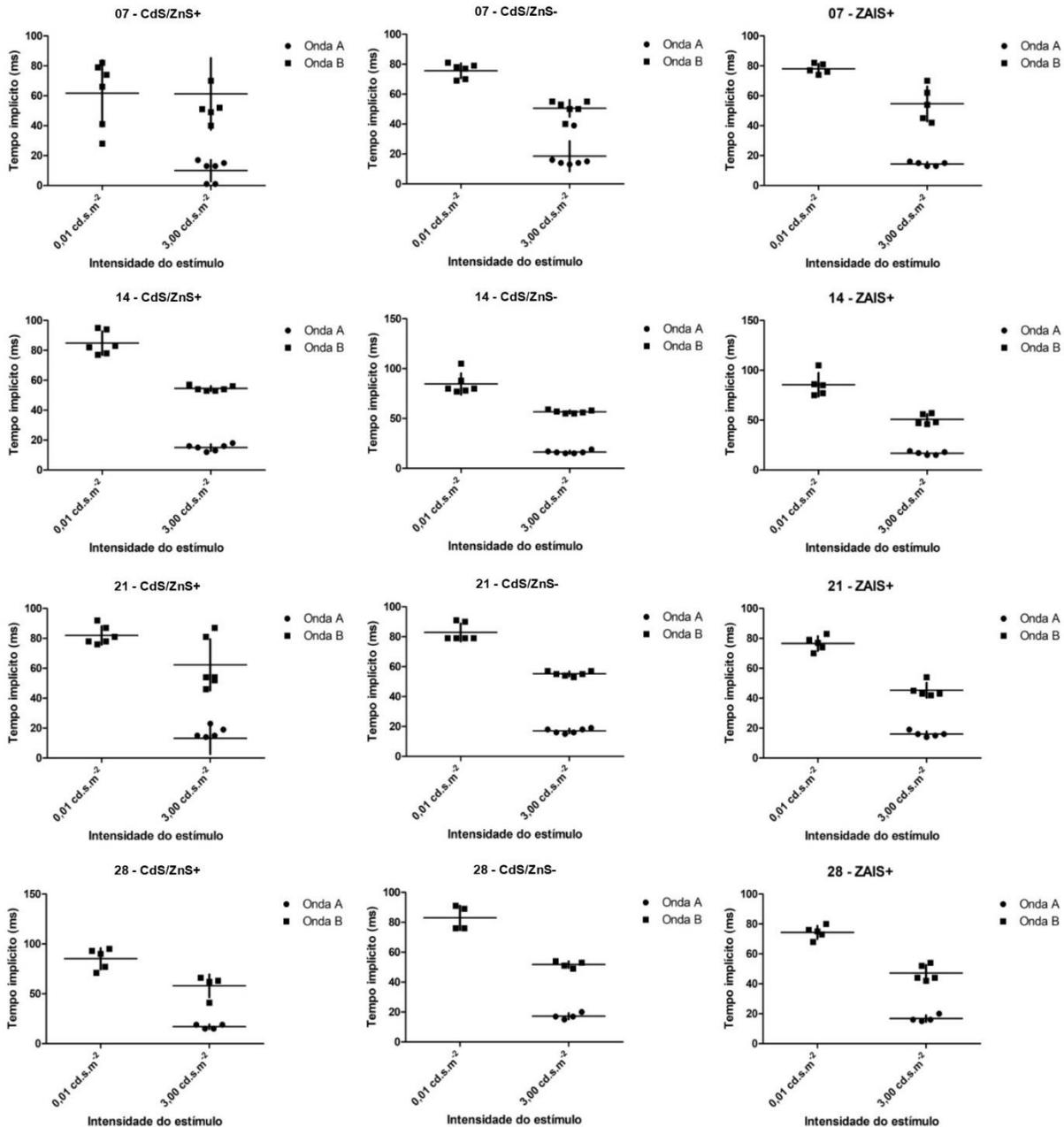
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Amplitudes das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).



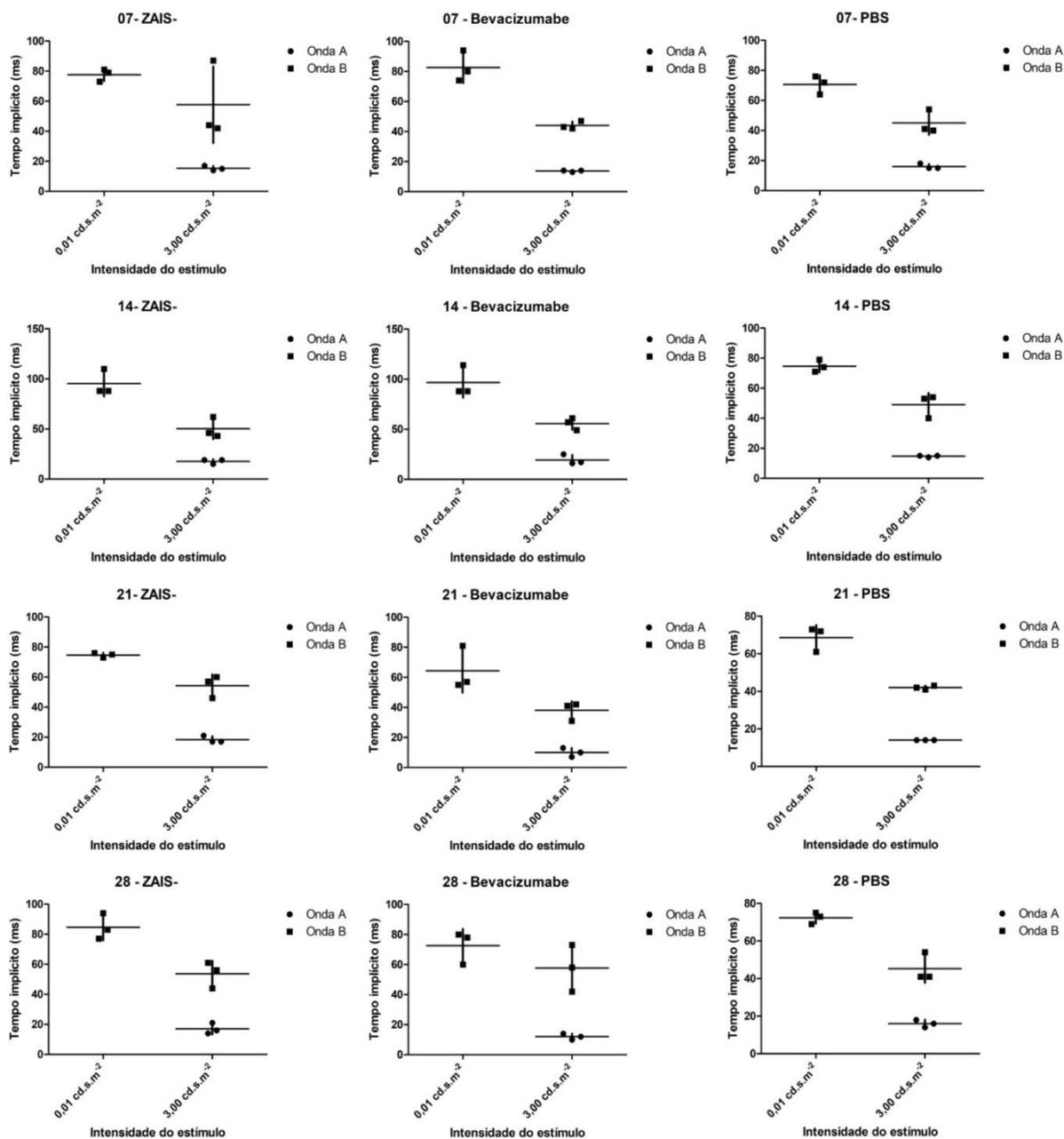
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados (continuação).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 02 – Amplitudes e tempos implícitos de registro das ondas A e B referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.

Amostra	Estímulo (cd.s.m ⁻²)	Onda	Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
			Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)
CdS/ZnS+	0,01	B	206,57 ± 121,06	63,86 ± 21,00	136,50 ± 44,45	84,83 ± 7,83	222,97 ± 61,68	82,00 ± 6,22	232,81 ± 68,95	85,20 ± 10,59
	3,00	A	-178,89 ± 115,71	10,00 ± 7,12	-177,03 ± 57,97	15,00 ± 2,19	-241,49 ± 176,22	13,17 ± 10,44	-221,55 ± 40,35	17,00 ± 2,30
	3,00	B	224,00 ± 130,34	61,33 ± 23,96	277,87 ± 89,26	54,50 ± 1,64	269,70 ± 95,24	62,33 ± 17,14	319,59 ± 144,12	58,00 ± 11,46
CdS/ZnS-	0,01	B	254,36 ± 80,85	75,00 ± 4,87	194,03 ± 68,85	85,88 ± 9,61	208,15 ± 78,37	81,50 ± 5,65	231,22 ± 73,66	83,00 ± 8,12
	3,00	A	-243,02 ± 55,81	20,13 ± 11,74	-222,93 ± 64,66	15,75 ± 1,66	-256,62 ± 67,61	16,38 ± 1,92	-235,76 ± 101,42	17,25 ± 2,06
	3,00	B	357,02 ± 68,59	51,13 ± 4,91	323,31 ± 111,66	55,38 ± 4,03	316,84 ± 85,97	55,63 ± 1,68	307,50 ± 78,87	51,75 ± 2,21
ZAIS+	0,01	B	314,06 ± 104,19	78,00 ± 3,39	254,87 ± 68,84	85,60 ± 11,87	314,58 ± 107,18	76,60 ± 4,93	264,01 ± 171,59	74,40 ± 4,39
	3,00	A	-291,35 ± 74,06	14,40 ± 1,34	-271,58 ± 78,50	16,80 ± 1,78	-313,46 ± 67,55	16,00 ± 1,87	-203,50 ± 133,96	16,60 ± 1,94
	3,00	B	273,75 ± 108,90	54,60 ± 11,65	286,71 ± 100,81	50,8 ± 5,26	334,02 ± 122,04	45,40 ± 4,93	287,51 ± 145,75	47,20 ± 5,40
ZAIS-	0,01	B	185,94 ± 88,18	77,67 ± 4,16	184,37 ± 106,89	95,33 ± 12,7	174,63 ± 130,90	74,67 ± 1,52	176,16 ± 110,68	84,67 ± 8,62
	3,00	A	-321,79 ± 142,22	15,33 ± 1,52	-161,61 ± 67,49	17,67 ± 2,30	-161,45 ± 96,20	18,33 ± 2,30	-152,07 ± 133,95	17,00 ± 3,60
	3,00	B	269,64 ± 104,84	57,67 ± 25,42	234,61 ± 204,22	50,33 ± 10,21	159,98 ± 149,58	54,33 ± 7,37	164,78 ± 154,73	53,67 ± 8,73
Bevacizumabe	0,01	B	149,47 ± 77,68	82,67 ± 10,26	193,31 ± 263,10	96,67 ± 15,01	172,02 ± 232,25	64,33 ± 14,47	163,00 ± 255,62	72,67 ± 11,02
	3,00	A	-215,92 ± 208,97	13,67 ± 0,57	-80,36 ± 60,13	19,33 ± 4,93	-146,08 ± 255,69	10,00 ± 3,00	-141,63 ± 222,44	12,00 ± 2,00
	3,00	B	216,72 ± 143,38	44,00 ± 2,64	58,07 ± 94,67	55,67 ± 6,11	153,86 ± 228,39	38,00 ± 6,08	175,01 ± 258,95	57,67 ± 15,5
PBS	0,01	B	309,40 ± 79,99	70,67 ± 6,11	367,57 ± 48,65	74,67 ± 4,04	331,46 ± 57,82	68,67 ± 6,65	403,24 ± 30,52	72,33 ± 3,05
	3,00	A	-316,86 ± 15,18	16,00 ± 1,73	-397,36 ± 44,09	14,67 ± 0,57	-396,87 ± 45,73	14,00 ± 0,00	-358,80 ± 22,27	16,00 ± 2,00
	3,00	B	408,77 ± 31,22	45,00 ± 7,81	330,61 ± 100,91	49,00 ± 7,81	310,85 ± 126,46	42,00 ± 1,00	409,37 ± 20,90	45,33 ± 7,50

5.3.2 Relação entre as ondas B e A

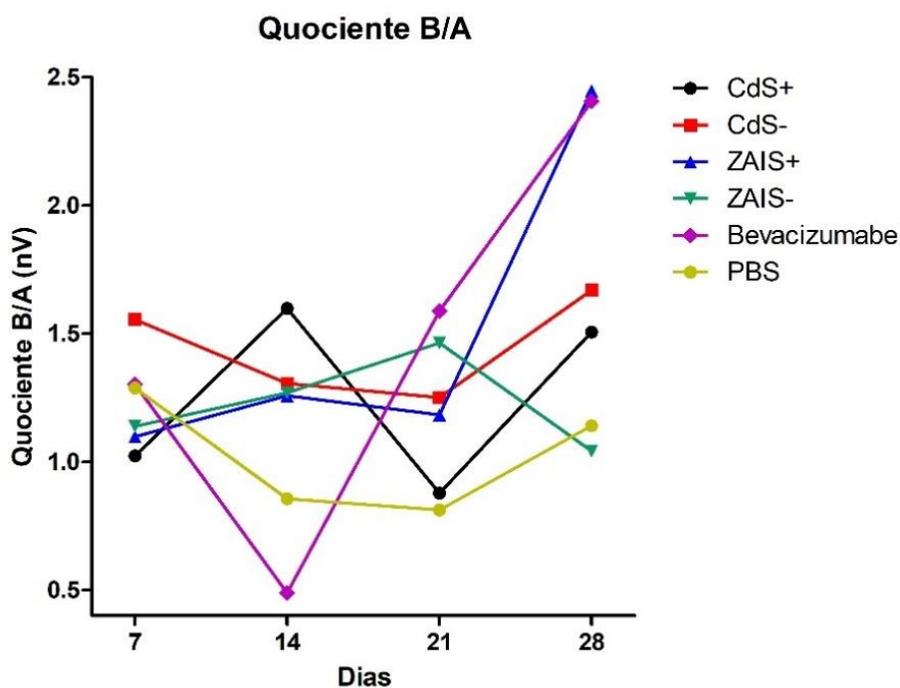
Na análise eletrorretinográfica, a relação matemática expressa pelo quociente entre as amplitudes em módulo das ondas A e B registradas constitui uma importante ferramenta para investigação de possíveis danos na retina e sua possível localização.

Essa relação foi investigada para todas as amostras estudadas nos dias avaliados, e seus resultados estão dispostos na **Tabela 03** e na **Figura 25**. De maneira geral, não foram detectadas variações significativas para as amostras em relação ao controle negativo durante o período avaliado.

Tabela 03 – Valores calculados da relação B/A referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.

Dias	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-	Bevacizumabe	PBS
7	1,02	1,55	1,09	1,13	1,30	1,28
14	1,59	1,30	1,25	1,26	0,48	0,85
21	0,87	1,25	1,18	1,46	1,58	0,81
28	1,50	1,66	2,44	1,04	2,40	1,14

Figura 25 – Valores de relação B/A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Avaliação da sensibilidade da retina à luz

Na realização da análise eletrorretinográfica, é fundamental que seja feita a avaliação da resposta da retina frente a estímulos luminosos de diferentes intensidades. Com isso, é possível verificar o ponto de saturação da resposta da retina, isto é, a menor intensidade luminosa frente à qual a ocorre a saturação da sua atividade. Também é usual, nesta análise, a verificação do ponto de semissaturação da resposta da retina, isto é, a intensidade luminosa frente à qual a resposta eletrorretinográfica corresponde a 50% da resposta máxima registrada. Estas informações permitem avaliar a ocorrência de processo de sensibilização ou dessensibilização da retina a estímulos luminosos.

As relações entre a intensidade do estímulo e resposta eletrorretinográfica estão dispostas na **Figura 26**, onde em cada figura, a área cinza representa o perfil do controle negativo (PBS) e o seu desvio padrão, para fins de comparação. A partir destes dados foi possível encontrar a amplitude máxima de resposta, o ponto de semissaturação K e a constante de ganho n. Para cada amostra nos diferentes dias avaliados, estes dados estão dispostos nas **Tabelas 04, 05 e 06**, respectivamente, e na **Figura 27**.

Tabela 04 – Valores de V_{\max} (μV) referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.

Dia	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-	Bevacizumabe	PBS
7	185,57	191,44	289,07	279,98	242,20	346,32
14	155,56	165,97	256,83	223,27	208,04	318,07
21	276,99	204,45	309,14	196,19	229,25	297,84
28	304,50	298,02	232,01	190,83	258,57	404,09

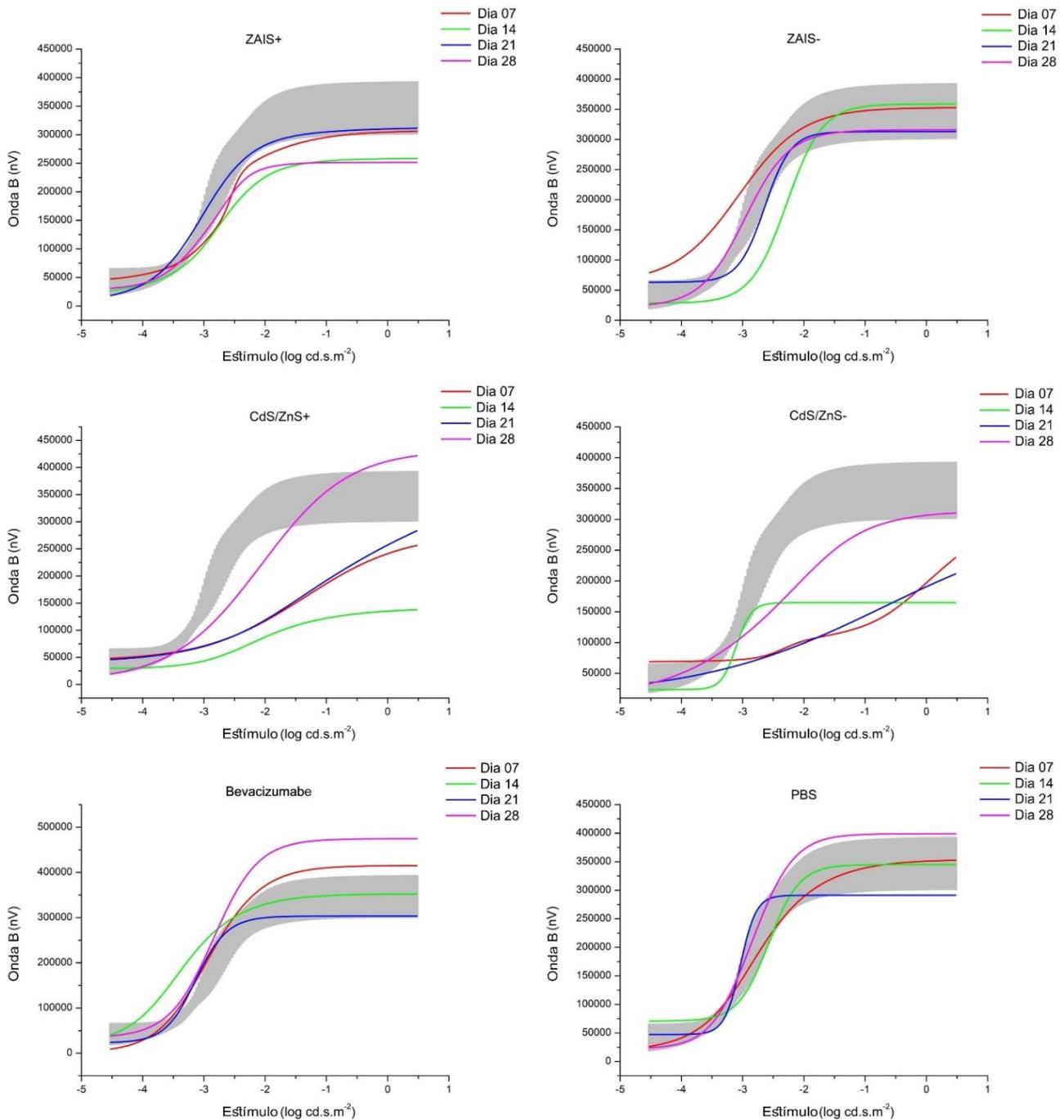
Tabela 05 – Pontos de semissaturação K (cd.s.m^{-2}) referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.

Dia	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-	Bevacizumabe	PBS
7	0,231	0,010	0,002	0,001	0,002	0,002
14	0,008	0,002	0,001	0,004	0,0001	0,001
21	0,052	0,007	0,0009	0,002	0,001	0,0006
28	0,004	0,004	0,001	0,001	0,001	0,0015

Tabela 06 – Constantes de ganho n referentes às amostras estudadas, nos tempos avaliados.

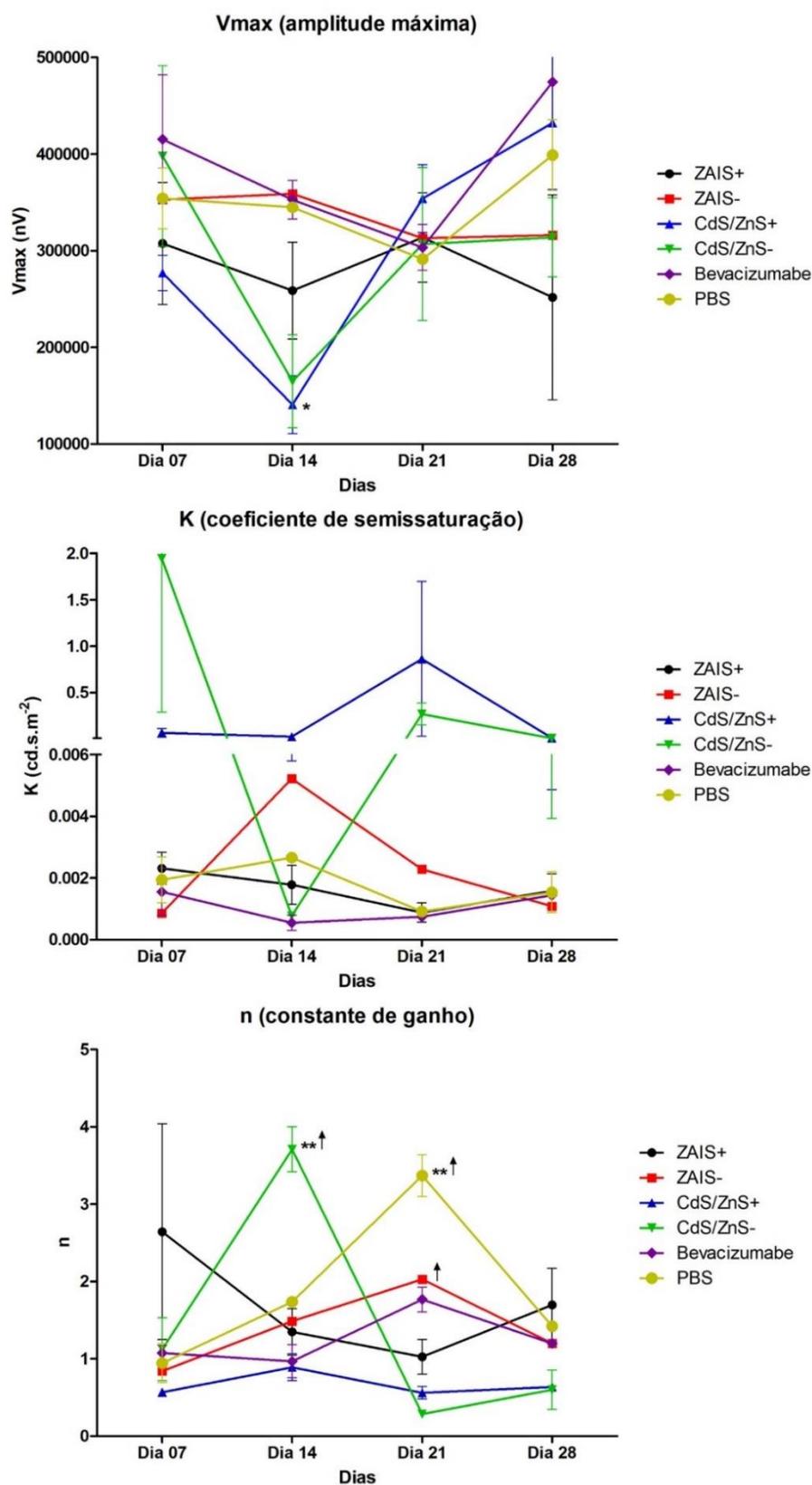
Dia	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-	Bevacizumabe	PBS
7	0,568	1,123	2,642	0,841	1,076	0,944
14	0,889	3,710	1,348	1,488	0,969	1,737
21	0,562	0,285	1,026	2,029	1,767	3,370
28	0,635	0,600	1,697	1,202	1,199	1,423

Figura 26 – Relações entre resposta e estímulo luminoso para as amostras estudadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 – Coeficientes V_{max} , K e n nos dias avaliados



** Valor significativamente acima da média (intra-dia)

* Valor significativamente abaixo da média (intra-dia)

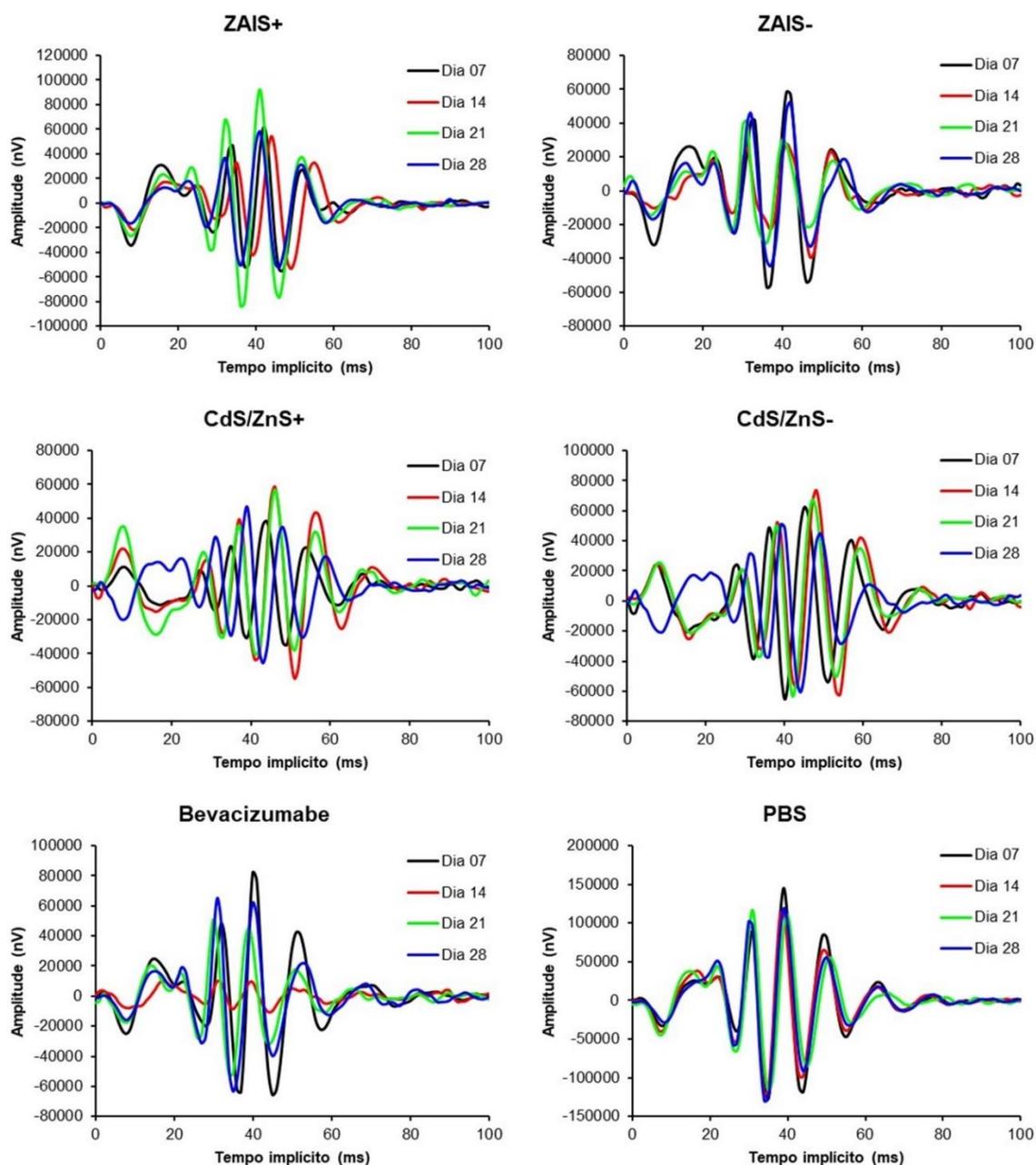
† Valor acima da média da amostra

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 Potenciais oscilatórios

Os potenciais oscilatórios, obtidos a partir da onda B dos eletrorretinogramas, são importantes marcadores da atividade da retina neural. Os dados obtidos dos potenciais oscilatórios estão dispostos na **Figura 28** e na **Tabela 07**. Na **Figura 29** e na **Tabela 08**, estão representados os resultados da área sob a curva de resposta oscilatória.

Figura 28 – Potenciais oscilatórios referentes às amostras testadas.

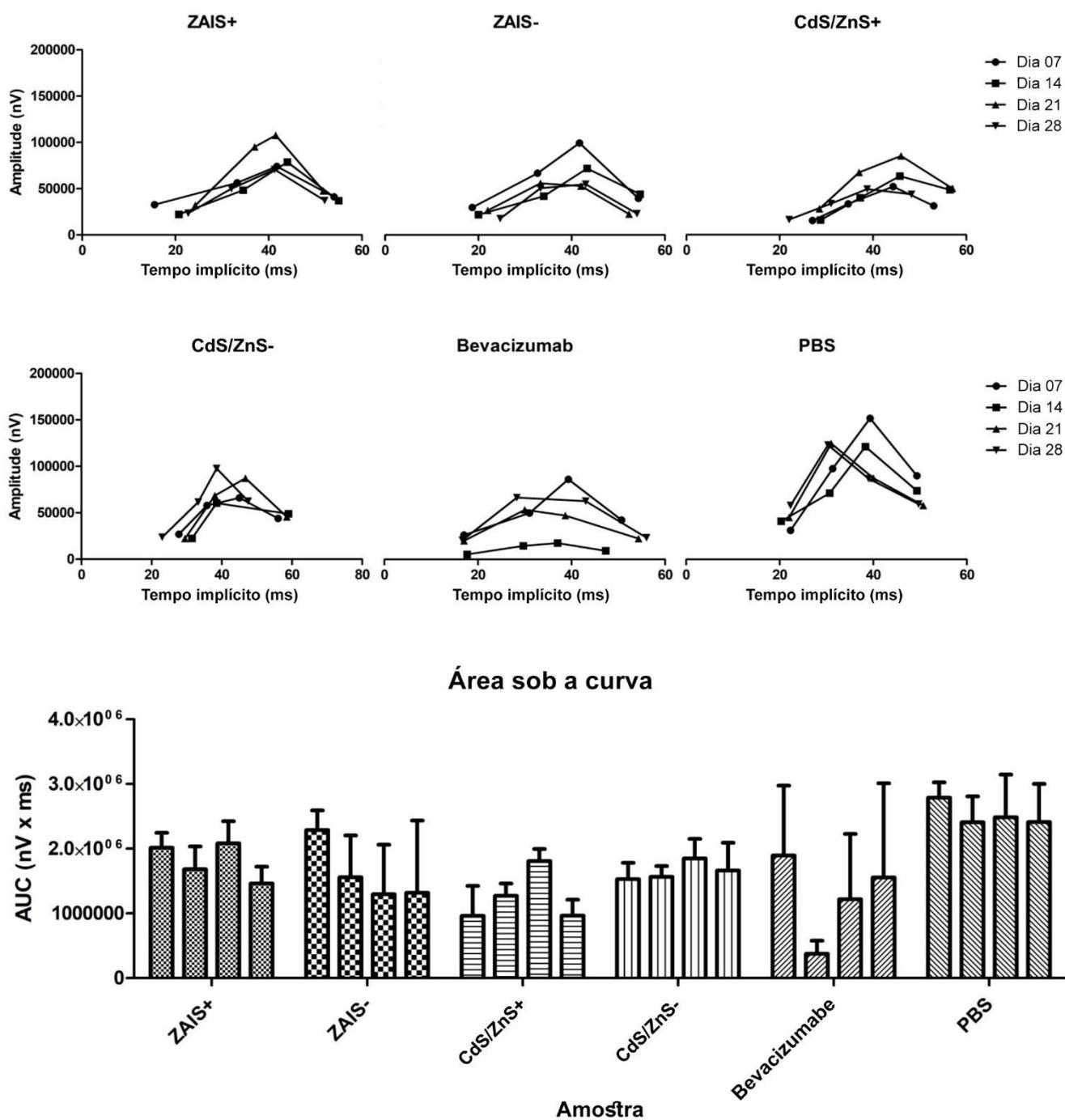


Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 07 - Dados dos potenciais oscilatórios para as amostras testadas.

Onda	Dia 07		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)	Amplitude (μV)	Tempo implícito (ms)
ZAIS+								
P1	$32,76 \pm 8,16$	$15,50 \pm 1,29$	$22,19 \pm 8,94$	$20,75 \pm 6,08$	$31,88 \pm 13,85$	$24,25 \pm 1,26$	$23,62 \pm 12,46$	$22,75 \pm 1,71$
P2	$56,43 \pm 15,03$	$33,25 \pm 0,96$	$48,41 \pm 30,83$	$34,50 \pm 1,73$	$95,29 \pm 20,79$	$37,00 \pm 5,83$	$50,04 \pm 21,82$	$32,00 \pm 1,41$
P3	$74,01 \pm 19,62$	$41,75 \pm 1,26$	$78,72 \pm 35,29$	$44,00 \pm 1,41$	$107,80 \pm 29,91$	$41,50 \pm 1,00$	$70,69 \pm 21,12$	$41,25 \pm 0,96$
P4	$41,19 \pm 26,27$	$54,00 \pm 3,56$	$37,00 \pm 29,66$	$55,00 \pm 1,63$	$47,77 \pm 16,86$	$51,75 \pm 1,71$	$37,33 \pm 25,98$	$52,00 \pm 1,15$
ZAIS-								
P1	$29,79 \pm 7,53$	$18,67 \pm 4,62$	$21,98 \pm 19,24$	$20,00 \pm 3,61$	$26,64 \pm 25,04$	$22,00 \pm 2,00$	$17,71 \pm 20,23$	$24,67 \pm 2,08$
P2	$66,81 \pm 1,46$	$32,67 \pm 1,53$	$41,91 \pm 35,06$	$34,00 \pm 2,65$	$55,97 \pm 69,30$	$33,33 \pm 2,08$	$50,66 \pm 74,39$	$33,33 \pm 1,53$
P3	$99,35 \pm 24,51$	$41,67 \pm 1,53$	$71,97 \pm 53,17$	$43,33 \pm 2,08$	$52,84 \pm 52,98$	$42,00 \pm 1,73$	$54,90 \pm 82,84$	$43,00 \pm 1,00$
P4	$39,59 \pm 25,61$	$54,33 \pm 3,06$	$44,05 \pm 42,46$	$54,67 \pm 2,52$	$22,62 \pm 16,94$	$52,33 \pm 1,53$	$23,06 \pm 24,86$	$54,00 \pm 3,61$
CdS/ZnS+								
P1	$15,38 \pm 14,26$	$27,00 \pm 1,00$	$15,92 \pm 4,59$	$28,75 \pm 0,96$	$28,00 \pm 8,64$	$28,50 \pm 1,29$	$16,35 \pm 4,50$	$22,00 \pm 0,82$
P2	$33,46 \pm 28,28$	$34,67 \pm 1,53$	$39,92 \pm 13,19$	$37,25 \pm 0,50$	$67,46 \pm 23,56$	$37,00 \pm 1,63$	$33,82 \pm 21,85$	$31,00 \pm 1,41$
P3	$52,10 \pm 41,35$	$44,33 \pm 0,58$	$63,45 \pm 19,68$	$45,75 \pm 0,50$	$85,31 \pm 17,29$	$46,00 \pm 1,63$	$49,44 \pm 34,23$	$38,75 \pm 0,96$
P4	$31,19 \pm 26,43$	$53,00 \pm 1,00$	$48,65 \pm 15,96$	$56,50 \pm 1,29$	$50,12 \pm 19,34$	$57,00 \pm 2,94$	$43,68 \pm 16,43$	$48,25 \pm 1,50$
CdS/ZnS-								
P1	$26,91 \pm 5,05$	$27,75 \pm 0,96$	$22,46 \pm 6,50$	$31,50 \pm 3,70$	$22,33 \pm 6,28$	$29,50 \pm 0,58$	$23,76 \pm 10,79$	$23,00 \pm 1,41$
P2	$57,98 \pm 20,94$	$35,75 \pm 1,26$	$60,45 \pm 4,06$	$38,50 \pm 1,29$	$68,56 \pm 18,45$	$38,00 \pm 1,15$	$61,55 \pm 25,86$	$33,25 \pm 4,19$
P3	$66,11 \pm 22,36$	$45,00 \pm 0,82$	$296,27 \pm 432,15$	$47,75 \pm 1,26$	$87,17 \pm 30,29$	$46,75 \pm 1,50$	$97,71 \pm 34,49$	$38,50 \pm 1,73$
P4	$43,94 \pm 9,22$	$56,00 \pm 1,41$	$48,86 \pm 17,98$	$59,00 \pm 1,41$	$45,52 \pm 15,49$	$58,50 \pm 1,29$	$62,64 \pm 31,37$	$47,50 \pm 2,52$
Bevacizumabe								
P1	$26,24 \pm 20,90$	$17,00 \pm 3,46$	$5,41 \pm 3,92$	$17,67 \pm 2,08$	$20,02 \pm 27,00$	$17,00 \pm 5,57$	$20,77 \pm 32,74$	$16,67 \pm 4,62$
P2	$49,83 \pm 49,31$	$31,00 \pm 1,73$	$14,64 \pm 11,72$	$29,67 \pm 2,52$	$53,36 \pm 83,60$	$30,00 \pm 2,00$	$66,64 \pm 110,67$	$28,33 \pm 2,52$
P3	$86,26 \pm 85,68$	$39,33 \pm 2,08$	$17,50 \pm 18,47$	$37,00 \pm 3,00$	$47,22 \pm 76,49$	$38,67 \pm 0,58$	$62,72 \pm 105,25$	$43,00 \pm 3,00$
P4	$42,36 \pm 48,48$	$50,67 \pm 0,58$	$9,30 \pm 9,07$	$47,33 \pm 3,06$	$22,38 \pm 28,43$	$54,33 \pm 5,77$	$23,35 \pm 36,79$	$56,00 \pm 2,65$
PBS								
P1	$31,23 \pm 5,35$	$22,33 \pm 0,58$	$41,05 \pm 6,66$	$20,33 \pm 2,89$	$45,19 \pm 8,03$	$22,00 \pm 1,00$	$58,03 \pm 12,67$	$22,33 \pm 1,15$
P2	$97,81 \pm 16,44$	$31,33 \pm 0,58$	$71,40 \pm 56,06$	$30,67 \pm 0,58$	$124,76 \pm 45,37$	$31,00 \pm 1,00$	$123,28 \pm 25,87$	$30,33 \pm 1,15$
P3	$151,97 \pm 25,34$	$39,33 \pm 0,58$	$121,41 \pm 19,81$	$38,33 \pm 0,58$	$87,53 \pm 70,59$	$40,00 \pm 1,00$	$86,98 \pm 67,07$	$39,00 \pm 0,00$
P4	$90,05 \pm 13,54$	$49,33 \pm 0,58$	$73,94 \pm 6,25$	$49,33 \pm 1,53$	$58,07 \pm 19,47$	$50,67 \pm 0,58$	$59,54 \pm 14,26$	$49,67 \pm 1,15$

Figura 29 – Avaliação global da resposta oscilatória frente às amostras testadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 08 – Áreas sob as curvas ($\mu\text{V}\cdot\text{ms}$) da resposta oscilatória das cobaias frente às amostras testadas.

	ZAIS+	ZAIS-	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	Bevacizumabe	PBS
Dia 07	2014,25 ± 462,71	2289,33 ± 521,59	961,36 ± 801,03	1527,80 ± 506,71	1895,83 ± 1866,87	2787,66 ± 409,01
Dia 14	1681,15 ± 709,03	1556,74 ± 1125,19	1270,46 ± 380,23	1563,33 ± 293,02	375,80 ± 349,27	2407,33 ± 694,13
Dia 21	2082,50 ± 682,49	1295,76 ± 1326,56	1807,00 ± 374,00	1848,50 ± 604,31	1219,72 ± 1748,87	2483,66 ± 1144,24
Dia 28	1461,08 ± 521,21	1318,99 ± 1930,38	964,67 ± 492,38	1662,66 ± 859,27	1555,64 ± 2522,47	2412,33 ± 1019,97

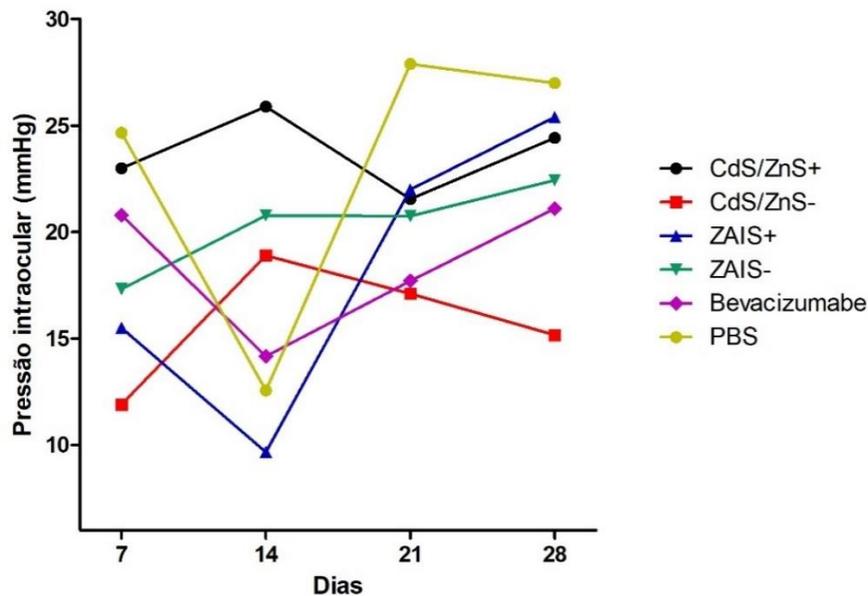
5.4 Avaliação da pressão intraocular (PIO)

Uma vez que a injeção intravítrea é um procedimento dotado de determinado grau de invasividade, que altera momentaneamente o volume do olho e insere substâncias em concentração relativamente alta e de maneira abrupta, é importante verificar a manutenção da pressão ocular após este. As médias de três medidas com erro $\leq 5\%$ da avaliação da PIO nos animais durante o período avaliado estão dispostos na **Figura 30** e na **Tabela 09**.

Tabela 09 – Médias das medidas da PIO (mmHg) para as amostras nos tempos avaliados.

Dias	CdS/ZnS+	CdS/ZnS-	ZAIS+	ZAIS-	Bevacizumabe	PBS
07	23,00	11,91	15,500	17,33	20,80	24,67
14	25,90	18,90	9,667	20,78	14,17	12,56
21	21,55	17,11	22,000	20,75	17,71	27,89
28	24,43	15,17	25,400	22,44	21,11	27,00

Figura 30 – Médias da PIO para as amostras nos tempos avaliados e suas linhas de tendência.

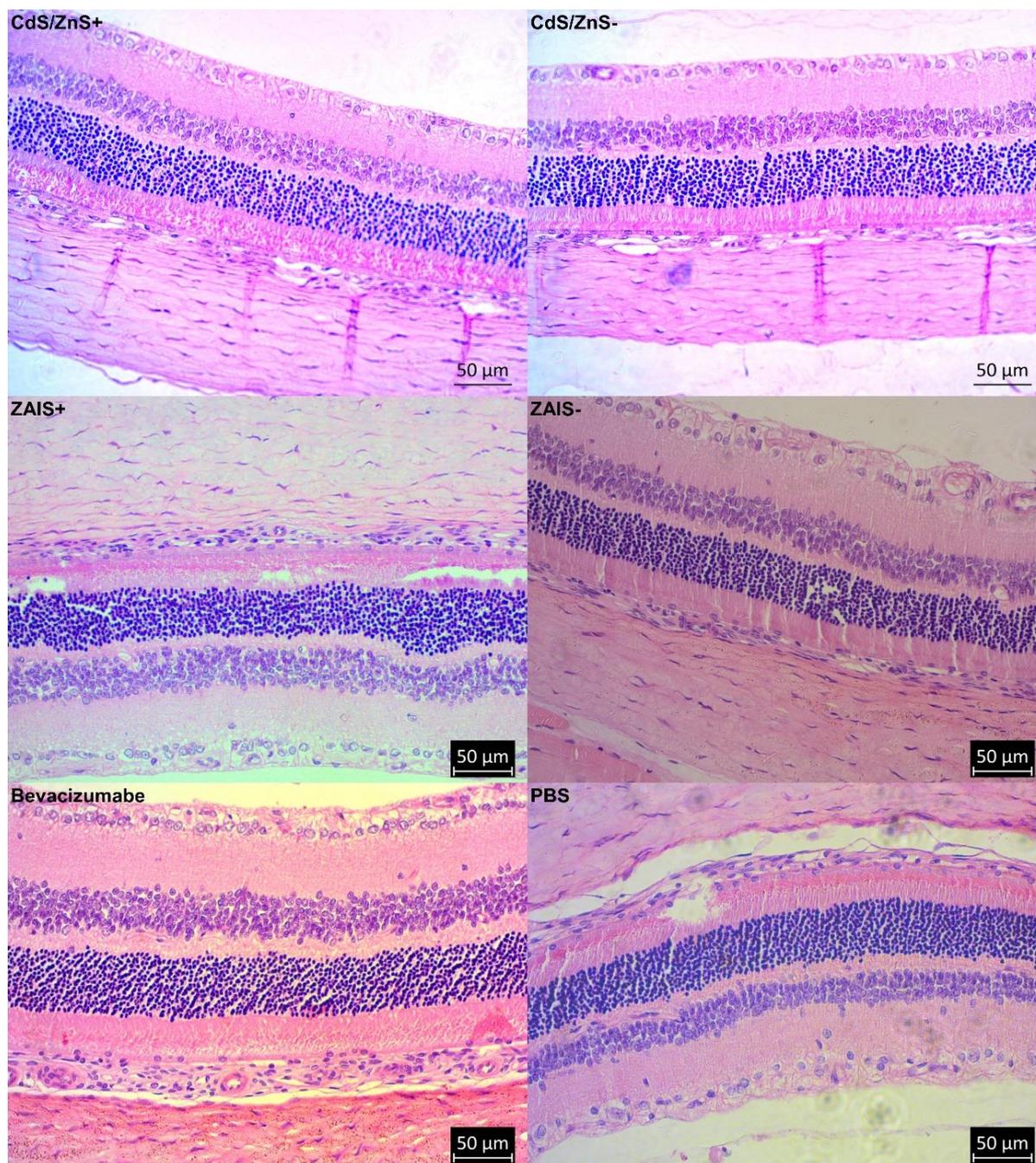


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação histológica

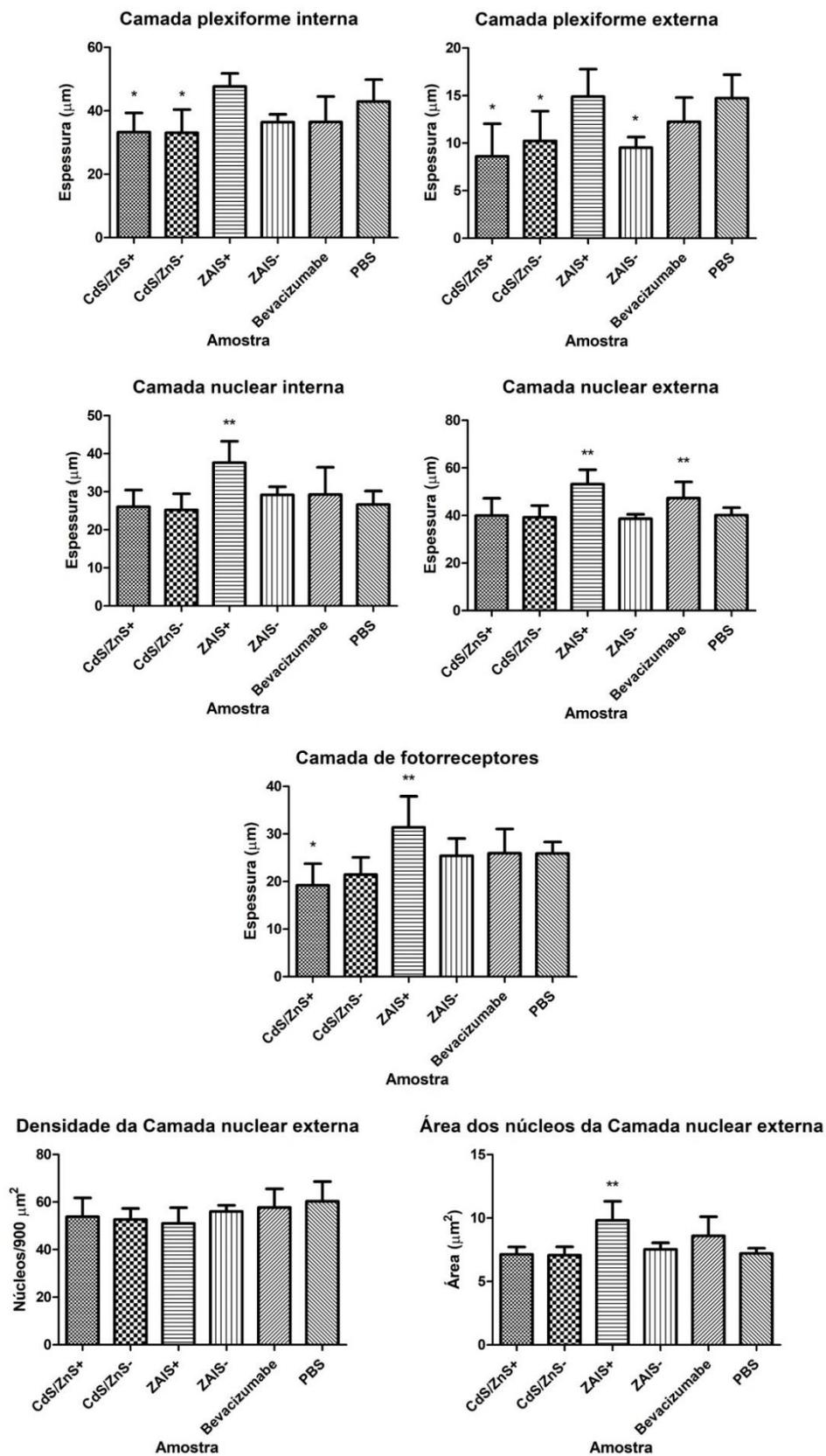
A manutenção da estrutura retiniana foi avaliada por meio de cortes histológicos, cujas imagens representativas para cada amostra estão dispostas na **Figura 31**. De maneira geral, não foram notadas alterações morfológicas que caracterizassem processos inflamatórios ou de morte celular. Também não foi encontrada, em nenhum dos olhos avaliados, desorganização das camadas da retina ou de suas estruturas. A **Figura 32** apresenta as medidas de cinco camadas da retina e a análise da densidade da camada nuclear externa e a medida da área de seus núcleos. Na análise de TUNEL, foi possível observar predominantemente a fluorescência da contracoloração DAPI, em azul, evidenciando núcleos saudáveis na estrutura da retina. Não foi observado, em nenhum dos cortes, corpos apoptóticos corados por TUNEL. Imagens representativas desta análise estão dispostas na **Figura 33**.

Figura 31 – Imagens representativas dos cortes histológicos obtidos para as amostras estudadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Medida das camadas da retina a partir dos cortes histológicos.

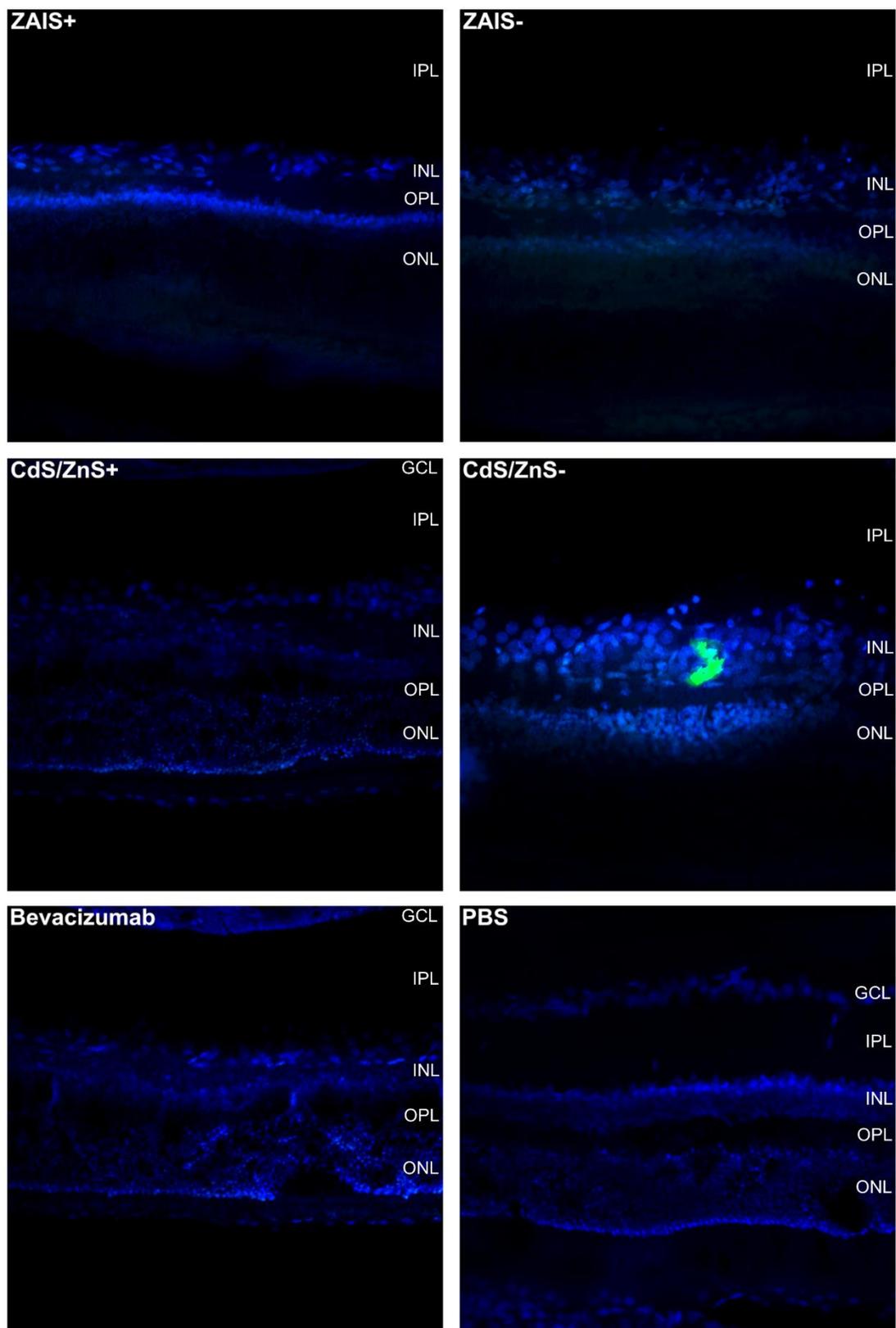


* = Redução estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($\alpha = 0,05$).

** = Aumento estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($\alpha = 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Imagens representativas de secções de retina dos animais tratados com cada amostra, tratadas com TUNEL.



ONL – camada nuclear externa; OPL – camada plexiforme externa; INL – camada nuclear interna; IPL – camada plexiforme interna; GCL – camada de células ganglionares.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização físico-química

Pontos quânticos revestidos com sulfeto de zinco têm chamado a atenção principalmente como biomarcadores de imagem devido às suas características de fotoluminescência otimizadas por esse tipo de revestimento, que também confere às partículas uma melhor estabilidade e biocompatibilidade (MANSUR et al., 2014; CHEN et al., 2015, CAIRES et al., 2020).

Os materiais avaliados neste trabalho apresentaram amplo espectro de absorção na região do ultravioleta-visível. A região de absorção dos pontos quânticos de estrutura núcleo-casca está diretamente relacionada à energia de banda proibida dos materiais que os compõem. Pontos quânticos de sulfeto de zinco apresentam tipicamente energia de banda proibida por volta de 3,90 eV e *onset* de absorção em cerca de 287 nm, enquanto pontos quânticos de sulfeto de cádmio apresentam energia de banda proibida de cerca de 2,57 eV e *onset* de absorção em cerca de 456 nm. Uma partícula composta pelos dois materiais apresentará uma energia de banda proibida intermediária, de cerca de 2,85 eV, com um *onset* de absorção também intermediário. O *onset* de absorção encontrado para as amostras CdS/ZnS neste trabalho foi de cerca de 430 nm ([Figura 10](#)). Entretanto, estes valores podem flutuar de acordo com a variação do tamanho partícula, das espessuras do núcleo e da casca, entre outros fatores (MANSUR et al., 2017).

De maneira semelhante, o *onset* de absorção das partículas AIS (Ag-In-S₂) se dá em por volta de 600 nm, com energia de banda proibida de cerca de 1,98 eV, e por isso, ao receber o revestimento do sulfeto de zinco, seu *onset* de absorção se desloca para comprimentos de onda menores (*blue shift*). O *onset* de absorção das partículas ZAIS foi de cerca de 550 nm ([Figura 10](#)) (MANSUR et al., 2017).

Em ambos os sistemas foi observado que, após a conjugação ao bevacizumabe, houve um deslocamento do pico de absorção para comprimentos de onda maiores (*red shift*). Este achado foi atribuído à presença de aminoácidos com estruturas cíclicas insaturadas, como triptofano, tirosina e fenilalanina, tanto na cadeia leve quanto na cadeia pesada do anticorpo, que apresentam transição $\pi \rightarrow \pi^*$ nesta região do espectro.

Enquanto o espectro de absorção dos pontos quânticos fornece informações referentes à sua composição e à incorporação de materiais a essas partículas, o espectro de fotoluminescência fornece informações a respeito das propriedades físicas da

partícula, sobretudo sobre suas características de superfície, como tamanho e possíveis defeitos. Os pontos quânticos obtidos apresentaram em seu espectro de fotoluminescência bandas duplas de emissão, que provavelmente são devidas a estados de “armadilha”, isto é, defeitos de superfície que permitem a recombinação não-radioativa de energia, reduzindo a energia de alguns éxcitons, que por sua vez passam a emitir comprimentos de onda maiores do que o esperado. Esse tipo de estado pode ser causado por concentrações de precursores diferentes das razões estequiométricas no momento da síntese dos pontos quânticos, que gera em sua estrutura regiões de vacância de cátions ou ânions. Outros fatores que podem causar este fenômeno são a rota de síntese, o método, temperatura, agente estabilizador, entre outros (VEAMATHAU et al., 2015; KANG et al., 2015).

Os espectros de fotoluminescência indicam que os comprimentos de onda de 300, 350 e 400 nm foram os que geraram maior excitação dos pontos quânticos, o que condiz com a faixa de absorção encontrada (**Figuras 11 e 12**). Na amostra CdS/ZnS foram observadas duas bandas de emissão, em 437 nm (excitação em 350 nm) e em 587 nm (excitação em 400 nm), o que sugere a possível presença de defeitos de superfície nessas partículas, indicando ser necessária a otimização do processo de síntese dessas partículas. De maneira geral, o rendimento quântico obtido para as amostras foi de ordem esperada para partículas obtidas por rota aquosa (HODLUR e RABINAL, 2014).

As bandas de emissão observadas frente ao comprimento de onda de excitação de 300 nm, em 345 nm para CdS/ZnS+ e 343 nm para ZAIS+, podem estar relacionadas à fluorescência do bevacizumabe, que possui em sua estrutura aminoácidos com grupos fluoróforos, a exemplo do triptofano, presente tanto na cadeia leve quanto na cadeia pesada.

O potencial zeta é um parâmetro fundamental para prever a estabilidade dos pontos quânticos em suspensão. Valores diferentes de zero, em módulo, costumam ser preferíveis, para favorecer estabilidade do sistema coloidal. No caso de nanossuspensões, valores de módulo superiores a 20 mV são requeridos para as amostras em que a agregação possa ser dificultada por uma combinação de impedimento eletrostático e estérico (SUTRADHAR, KHATUN e LUNA, 2013). Por outro lado, valores excessivamente altos de potencial zeta podem aumentar a imobilização de moléculas polares, como água e proteínas, ao redor da partícula em meio biológico, levando a um aumento de seu diâmetro hidrodinâmico.

Para as quatro amostras trabalhadas, os valores de potencial zeta foram superiores a zero, conforme apresentados na [Tabela 01](#). Esses valores positivos podem estar relacionados aos grupamentos amina da quitosana, que protonados em meio aquoso, conferem às partículas uma carga positiva. Os menores valores encontrados para as partículas CdS/ZnS podem estar relacionados a sua composição e processo de síntese, uma vez que o íon Cd^{2+} , altamente polarizável, apresenta alta afinidade por grupos doadores de elétrons, como grupos contendo nitrogênio ou oxigênio, presentes na quitosana, formando com estes complexos estáveis e neutralizando sua carga. O processo de conjugação do bevacizumabe no revestimento orgânico dos pontos quânticos causou uma redução nos valores do potencial zeta, o que pode estar relacionado à substituição dos grupamentos amina por ligações amida após a conjugação.

O diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão é um importante ponto a ser verificado, uma vez que informa o tamanho relativo do sistema no meio, e dessa forma, relaciona-se com a biossegurança desse sistema. Isto porque partículas de diferentes diâmetros hidrodinâmicos terão rotas de eliminação diferentes no organismo, podendo ser eliminadas facilmente, ou se acumular em órgãos como fígado e baço, causando toxicidade. Em teoria, pontos quânticos na faixa de raio hidrodinâmico aqui encontrada, entre 20 e 100 nm, poderiam sofrer metabolismo hepático (GIRMA et al., 2017).

Os dois tipos de pontos quânticos apresentaram diferenças em relação aos seus diâmetros hidrodinâmicos. Os menores valores encontrados para as partículas CdS/ZnS ([Tabela 01](#)) também podem estar relacionados à complexação de grupos contendo nitrogênio ou oxigênio na quitosana por íons Cd^{2+} . Devido ao menor diâmetro hidrodinâmico, acredita-se que, neste tipo de partícula, a conjugação do bevacizumabe foi favorecida na porção externa do revestimento orgânico (ANDERSEN, 1984; CHEN et al., 2017).

No sistema ZAIS, por outro lado, um maior diâmetro hidrodinâmico das partículas foi detectado ([Tabela 01](#)), o que implica maior volume solvatado na camada orgânica pela maior disponibilidade de grupos polarizáveis. Com isso, é possível que a conjugação do bevacizumabe nessas partículas tenha ocorrido consideravelmente no interior da camada orgânica. A presença do anticorpo nesta região poderia possibilitar a interação entre grupos funcionais deste e da quitosana, e com isso, causar a redução do diâmetro hidrodinâmico da partícula com a conjugação.

É importante lembrar que para as partículas ZAIS foi observada uma queda no rendimento quântico após a sua conjugação com o bevacizumabe, de 5% para 3%, o que também pode ter sido causado pela incorporação do anticorpo no interior da camada orgânica. Neste caso, a proximidade entre o anticorpo (que contém grupos fluoróforos) e a superfície da partícula pode permitir a transmissão de energia de carga para esses grupos quando da excitação luminosa, resultando em uma redução da fotoluminescência do ponto quântico.

O espectro de absorção no infravermelho ([Figura 13](#)) para as amostras permite verificar nestas a substituição de grupamentos amina livres (3450 a 3200 e 1565 cm^{-1}), provenientes da quitosana antes da conjugação, por ligações amida (1640 , 1540 e 1240 cm^{-1}), formadas a partir de grupos amina da quitosana e grupos carboxila do bevacizumabe após a conjugação do anticorpo pela via EDC/Sulfo-NHS. Após a conjugação, também é possível verificar bandas sugestivas de grupamentos amina livre, em cerca de 3300 cm^{-1} , entretanto, a esta banda torna-se mais estreita e fraca, sugerindo a redução no número de grupamentos amina na quitosana (RAMANERY, MANSUR e MANSUR, 2013; MANSUR et al., 2014; MANSUR et al., 2015; TANGSADTHAKUN et al., 2017).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão ([Figura 14](#)) permitiram verificar a obtenção de sistemas nanoparticulados relativamente monodispersos ([Figura 15](#)), com partículas predominantemente de morfologia esférica e tamanhos em cuja faixa reporta-se que está presente o regime de confinamento quântico (AMARAL-JÚNIOR, 2021).

As imagens permitiram também confirmar a estrutura cristalina das partículas, visível como linhas contínuas de organização no interior destas. Os espectros de energia dispersiva de raios-x ([Figura 16](#)), por sua vez, confirmaram a composição química das amostras, apresentando picos sugestivos de zinco ($8,63$ e $9,58$ keV), cádmio ($2,64$, $3,34$ e $3,61$ keV) e enxofre ($2,31$ keV) para os pontos quânticos CdS/ZnS, e de zinco ($8,70$ e $9,61$ keV), índio ($0,32$, $3,34$, $3,75$ e $3,98$ keV), prata ($2,99$ e $3,53$ keV) e enxofre ($2,34$ keV) para os pontos quânticos ZAIS. Para ambos os sistemas também foram observados picos para oxigênio ($0,53$ keV) e cobre ($0,81$, $0,94$, $8,09$ e $8,95$ keV) com grande intensidade, sendo estes associados à quitosana e à grade de microscopia, respectivamente.

6.2 Avaliação da atividade antiangiogênica

No embrião, a membrana alantóide surge com aproximadamente 3 dias de desenvolvimento. A alantóide aumenta de tamanho rapidamente entre 4 e 10 dias e sua porção mesenquimal se funde com a porção mesenquimal do cório, formando a membrana corioalantóica. Esta dupla membrana comporta o surgimento de uma rica vasculatura, que se conecta ao embrião a partir de duas artérias e uma veia alantóide. A resposta da vasculatura às amostras testadas quanto à atividade antiangiogênica surge geralmente no período de 72 a 96 horas após sua aplicação (RIBATTI, 2010; RIBATTI, 2017).

O modelo de neovascularização em membrana corioalantóica permite uma rápida avaliação de diversas substâncias quanto ao seu potencial de inibição ou estímulo da vascularização, análise de toxicidade, irritação, cultura de linhagens celulares, entre outros. Este modelo também é utilizado para relacionar a ação de substâncias aos seus efeitos na microvasculatura da retina (IRANMANESH et al., 2017; MOLAN, WEI e VUTHIJUMNONK, 2019; DOURADO et al., 2020).

O estudo da angiogênese em modelos como o da CAM é importante no campo da medicina, uma vez que em desordens de caráter isquêmico é importante estimular a angiogênese, enquanto em processos degenerativos e neoplásicos é importante reduzir a angiogênese. Além disso, o modelo permite também obter informações a respeito da biocompatibilidade da amostra, uma vez que permite a observação de fenômenos como hiperemia, hemorragia, coagulação, bem como anormalidades na estrutura vascular formada (VASCONCELOS et al., 2015; GÜRAN et al., 2018).

Não foram detectadas reduções significativas na área vascularizada por nenhuma das amostras avaliadas, exceto pelo bevacizumabe, conforme o esperado ([Figura 17](#)). Entretanto, a amostra CdS/ZnS+ foi capaz de reduzir o comprimento total de vasos e o número de junções, indicando que a dosagem presente de bevacizumabe foi capaz de impedir a formação de novos capilares, porém não de impedir a maturação de vasos principais (primários e secundários), que apresentam processos de vasculogênese mais intensa. As amostras ZAIS+ e ZAIS- também foram capazes de reduzir o número de junções, porém em uma intensidade menor. Para o parâmetro de lacunaridade não foram detectadas alterações significativas por nenhuma das amostras.

É importante ressaltar que a angiogênese é um processo complexo, podendo ocorrer por diferentes vias bioquímicas. Dessa forma, estímulos não-dependentes de

VEGF podem levar à formação de neovasos, como por exemplo a ativação da COX-2 em casos de microinflamações (KARAMAN et al., 2017).

6.3 Eletroretinografia

A técnica de eletroretinografia de campo total tem sido utilizada para testar a resposta da atividade da retina em humanos há décadas. A curva de eletroretinograma típica consiste em uma onda A, negativa, e uma onda B, positiva, além de potenciais oscilatórios. Com a variação das características do estímulo, como cor, duração, intensidade, frequência e adaptação ao claro ou ao escuro, é possível obter respostas de diferentes estruturas da retina e avaliar a sua funcionalidade (LIU et al., 2017; SHRADER e GREENTREE, 2018)

O eletroretinograma tem sido uma ferramenta chave na avaliação da toxicidade ocular de substâncias, em estudos pré-clínicos. Em primatas, a onda A do eletroretinograma é gerada na camada de fotorreceptores, e por isso utilizada para avaliar a atividade da retina externa, enquanto a onda B é gerada principalmente nas células bipolares-on, células gliais, e na camada plexiforme interna, e por isso utilizada para avaliar a atividade da retina interna. Entretanto, é importante ressaltar que esta técnica não consegue avaliar diretamente a atividade de células ganglionares (OSSWALD et al., 2017; CEHAJIC-KAPETANOVIC et al., 2018)

No eletroretinograma escotópico, os *flashes* de baixa intensidade produzem ondas B que são geradas a partir do estímulo aos bastonetes, fotorreceptores que possuem grande sensibilidade a estímulos luminosos. Na condição escotópica, os *flashes* de maior intensidade produzem uma onda A, referente a resposta mista de cones e bastonetes, juntamente uma onda B, relativa à atividade das células neurais, subsequente a esse estímulo. A amplitude da onda B está diretamente relacionada à amplitude da onda A (SONG et al., 2018).

É comum que, em estudos de toxicidade ocular, danos sejam detectados principalmente devido a variações na onda B do eletroretinograma, uma vez que esta corresponde principalmente à atividade das células que se encontram nas camadas mais internas da retina, sendo essas as células que entram em contato mais diretamente com a substância testada. Também é comum que, em casos de inflamações intraoculares transitórias, uma redução reversível da amplitude da onda B ocorra (TAKAHASHI et al., 2017; OSSWALD et al., 2017).

Na análise dos eletrorretinogramas obtidos, dispostos nas **Figuras 19 e 20** e na **Tabela 02**, não foram encontradas diferenças significativas de amplitude das ondas A ou B, tampouco em seus tempos implícitos, para nenhuma das amostras, tanto na avaliação intra-dia quanto na avaliação inter-dia. A única exceção foi para o controle negativo (PBS) no dia 14, cujas respostas de amplitudes se encontraram elevadas para as ondas A e B, mantendo-se os tempos implícitos. A ausência de variações significativas nas amplitudes e tempos implícitos é indicativa de que nenhuma das amostras foi tóxica para as células da retina, na dose testada neste estudo (WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2017; NAGAI et al., 2018).

A relação do quociente entre as amplitudes das ondas A e B é utilizada como parâmetro para avaliação da transmissão de sinais entre os fotorreceptores e as células bipolares-on, sendo este estudo importante na avaliação da retinopatia (Sussadee et al., 2017). No presente estudo, os valores obtidos para relação B/A (**Figura 25 e Tabela 03**) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhuma das amostras, o que sugere que não houve dano à transmissão de estímulos a partir dos fotorreceptores.

Ao analisar a resposta retiniana a estímulos luminosos de diferentes intensidades, notou-se que uma redução transitória e significativa da V_{max} (**Figura 27 e Tabela 04**) foi observada para CdS/ZnS+ e CdS/ZnS- no dia 14, porém, com retorno aos níveis normais nos dias seguintes. Para as demais amostras, não houve redução da V_{max} durante o período avaliado, indicando que a responsividade da retina à luz não foi prejudicada.

Ao considerar os valores de K (**Figura 27 e Tabela 05**), notou-se que, para as amostras CdS/ZnS+ e CdS/ZnS-, estes valores foram superiores aos observados para as demais amostras, sobretudo no início do período estudado. Isso pode indicar que os pontos quânticos CdS/ZnS poderiam interferir na função visual durante o período em que sua concentração estivesse mais alta, com a normalização da função visual à medida que são eliminados do olho.

A redução da sensibilidade retiniana, descrita por V_{max} e K, está alinhada ao aumento significativo no valor de n registrado para a amostra CdS/ZnS- no dia 14 (**Figura 27 e Tabela 06**). O aumento neste coeficiente indica que a saturação retiniana ocorre rápido frente a estímulos menos intensos. Essa alteração foi considerada transitória, pois os valores de n voltaram ao normal nos dias seguintes. Um aumento transitório também foi observado para a amostra de PBS no dia 21, no entanto, não relacionado a mudanças nos outros parâmetros avaliados.

Os potenciais oscilatórios compreendem ondas de alta frequência e baixa amplitude que são registradas no eletrorretinograma sobrepondo o braço ascendente da onda B. A origem do sinal, embora ainda não totalmente definida, está provavelmente relacionada à atividade celular na retina interna, compreendendo principalmente interações neurais entre axônios de células bipolares, processos de células de amacrina e dendritos de células ganglionares (HEYNEN, WACHTMEISTER e VAN NORREN, 1985; DONG, AGEY e HARE, 2004; KIZAWA et al., 2006).

Algumas mudanças significativas foram registradas em relação ao tempo implícito desses potenciais ([Figura 28](#) e [Tabela 07](#)). Para as amostras CdS/ZnS⁺ e CdS/ZnS⁻, houve um breve aumento no tempo implícito das quatro ondas entre os dias 07 e 14, seguido por uma redução gradual do seu tempo de registro a partir do dia 14, tornando-se estatisticamente significativo entre os dias 21 e 28. Essa alteração provavelmente está relacionada a alterações metabólicas na retina interna causadas pelas amostras administradas, portanto transitórias, pois o retorno da resposta normal da estrutura ocorreu à medida que as amostras eram eliminadas gradativamente do globo ocular. Ao final dos 28 dias, os tempos de registro dos potenciais oscilatórios dessas amostras tornaram-se comparáveis aos do controle negativo e das demais amostras.

É importante ressaltar que as reduções transitórias nas respostas do ERG (V_{max} , K, n e potenciais oscilatórios) frente às amostras CdS/ZnS podem ainda estar relacionadas à interferência do íon cádmio (Cd^{+2}) em canais de cálcio dependentes de voltagem, impedindo a ativação e propagação de potenciais elétricos na retina, uma vez que esses íons são potentes inibidores desses canais, ainda que em baixas concentrações (SWANDULLA e ARMSTRONG, 1989). A origem desses íons no meio ocular pode ser devida tanto à concentração residual de íons da síntese ou ainda ao desprendimento desses íons a partir das partículas em meio aquoso.

Também foi realizada uma avaliação global dos potenciais oscilatórios ([Figura 29](#) e [Tabela 08](#)), na qual foi possível verificar que todas as amostras obtiveram valores de AUC que tenderam a ser inferiores aos do controle negativo. No entanto, não foram verificadas diferenças significativas nas AUC dessas em função do tempo, sendo este um achado sugestivo de que não houve danos à retina interna causados pelas amostras administradas.

6.4 Avaliação da pressão intraocular (PIO)

A PIO é a pressão exercida no interior do olho pelo fluido aquoso produzido pelas células epiteliais do corpo ciliar. A verificação da manutenção da PIO para medicamentos administrados por via intravítrea é fundamental, principalmente para medicamentos formulados na forma de suspensão ou no caso de moléculas insolúveis (NATESAN et al., 2017; JHA et al., 2018)

A maioria das alterações na PIO após injeção intravítrea possui caráter transitório, onde geralmente se observa sua elevação com a modificação brusca do volume intraocular. Entretanto, em alguns casos essa elevação se torna permanente, ou persiste por períodos prolongados. Em outros casos também é possível verificar uma redução na PIO nos primeiros períodos após a injeção intravítrea (WANG et al., 2017; RÖSCH et al., 2017; BANTSEEV et al., 2018).

Para as amostras CdS/ZnS+, CdS/ZnS-, ZAIS- e bevacizumabe, não foram detectadas variações significativas em quaisquer dos tempos avaliados ([Figura 30](#) e [Tabela 09](#)). Para o controle negativo (PBS), foi detectada uma redução na PIO no dia 14, que voltou ao nível inicial nos dias 21 e 28. Essa variação foi considerada pontual, não fornecendo indício de alteração fisiológica do olho. Para a amostra ZAIS+, foi detectado o aumento da PIO a partir do dia 21, que persistiu no dia 28. Esta alteração, entretanto, não foi considerada significativa quando comparada aos demais grupos nos dias 21 e 28.

6.5 Análise histológica e morfométrica

Os cortes histológicos avaliados mostraram retinas com organização morfológica normal, com camadas organizadas de células em arranjos regulares ([Figura 31](#)). Algumas regiões mostraram rompimento entre a retina neural e o epitélio pigmentar da retina, sendo estes artefatos histológicos. Não foram encontradas células inflamatórias ou edema em nenhuma região dos cortes avaliados. Também não foram encontrados indícios de necrose ou apoptose em nenhuma região dos tecidos.

A análise morfométrica dos cortes histológicos ([Figura 32](#)) apontou que os pontos quânticos CdS/ZnS+, CdS/ZnS- e ZAIS- induziram uma redução na espessura da camada plexiforme externa, onde estão presentes os dendritos das células bipolares e os axônios das células horizontais, enquanto os dois primeiros induziram uma redução na

espessura da camada plexiforme interna, onde estão presentes os axônios de células bipolares e de amacrina e os dendritos das células ganglionares.

A diminuição na espessura das camadas plexiformes, estruturas que contém as árvores dendríticas da retina, provavelmente causada por sua condensação, está presente em processos degenerativos como na esclerose múltipla e na neurite óptica. A diminuição da espessura da camada também pode estar relacionada ao dano tecidual devido a processos de isquemia (CHEN, QIU e MA, 2017; RETTINGER e WANG, 2018; DIETRICH et al., 2018; NISHIOKA et al., 2019).

Os pontos quânticos ZAIS+ não induziram alterações nas camadas plexiformes, entretanto, esta amostra e o controle positivo (bevacizumabe) causaram um aumento na espessura da camada nuclear externa, que contém os núcleos dos fotorreceptores. Os pontos quânticos ZAIS+ também causaram um aumento na espessura da camada nuclear interna, que contém os corpos celulares das células bipolares, de amacrina e horizontais. O aumento na espessura da camada nuclear externa provavelmente ocorreu devido ao aumento no volume dos núcleos contidos nesta camada, uma vez que não houve alteração na densidade desse epitélio. Juntamente com o aumento da espessura da camada nuclear externa, os pontos quânticos ZAIS+ também causaram o aumento da espessura da camada de fotorreceptores.

Sajdak e colaboradores (2018) apontam que o espessamento da camada nuclear externa se relaciona com o da camada nuclear interna, possivelmente devido a mudanças nas células de Müller e no sistema glial da retina. O espessamento pode ser gerado por estresse aos fotorreceptores, precedendo a perda celular em quadros degenerativos. É possível que fatores de crescimento (como o fator de crescimento de fibroblastos e o fator ciliar neutrofílico) ajam de maneira protetiva em resposta a algum dano aos fotorreceptores, no intuito de prevenir a perda celular e, com isso, causando o aumento do tamanho das células e o aumento na espessura da camada nuclear externa.

O espessamento da retina pode se dar por diversos fatores, entre eles, a formação de edema. Entretanto, nesses casos, existe uma redução significativa na densidade do epitélio, com acúmulo de fluido no espaço intersticial, o que não é o caso dos achados neste trabalho, onde o espessamento da camada nuclear externa foi devido a um aumento no volume dos núcleos das células nessa camada. O espessamento da camada nuclear é apontado por Fernandez-Bueno e colaboradores (2017) como um achado que pode anteceder a atrofia tardia dessa estrutura.

É importante ressaltar que, apesar dos efeitos deletérios do desequilíbrio do VEGF nos tecidos oculares, níveis normais desses fatores apresentam importância para a manutenção de funções vasculares e neuronais. Assim, altas doses de fármacos anti-VEGF, que se ligam a todas as suas isoformas, apresentam certo nível de toxicidade para células neuronais. Como exemplo, o VEGFA₁₂₀ desempenha uma função de suporte na atividade de células ganglionares da retina. Wang e colaboradores (2017) também apontaram que a administração intravítrea de 5 mg/mL de bevacizumabe no globo ocular provocou apoptose dos fotorreceptores.

No ensaio TUNEL ([Figura 33](#)) não foram encontrados focos apoptóticos corados por este nos tecidos analisados, o que é, a princípio, um bom prognóstico de biocompatibilidade do sistema. Entretanto, para a amostra CdS/ZnS-, verificou-se alguns corpos fluorescentes presentes no espaço entre os núcleos da camada nuclear interna. A origem desses corpos pode estar relacionada ao acúmulo dessa amostra entre esses núcleos, uma vez que sua fluorescência (máximo em 587 nm para excitação a 400 nm) ocorre na região para a qual o detector foi ajustado (540 a 580 nm para TUNEL), porém com cor e localização diferentes do TUNEL. Dentre os pontos quânticos estudados, as partículas CdS/ZnS- foram aquelas que apresentaram menor diâmetro hidrodinâmico, propriedade que poderia lhe conferir a capacidade de se depositar em camadas mais internas de um tecido. Embora o achado não seja indicativo de destruição do epitélio, é possível que a amostra apresente tendência a se acumular na retina, o que pode levar a danos futuros ao seu funcionamento e à função visual.

7 CONCLUSÕES

Amostras de pontos quânticos com núcleos de CdS e de AgInS₂ recobertas com ZnS foram produzidas e conjugadas com sucesso ao bevacizumabe, utilizando via de produção em meio aquoso, sem a utilização de solventes orgânicos e de outros componentes potencialmente tóxicos, o que torna essas amostras, inicialmente, fortes candidatas a terem uma importante aplicabilidade em meio biológico, com finalidades farmacêutica e biomédica.

Essas amostras apresentaram propriedades de absorção da luz dentro do espectro UV-Visível, com regiões de absorção de energia compatíveis com os materiais que os compõem. Os pontos quânticos apresentaram espectro de emissão e rendimento quântico compatíveis com o que é esperado para pontos quânticos obtidos por via aquosa. A emissão de fótons foi observada dentro do espectro visível, o que indica potencial de uso para finalidade diagnóstica.

As partículas apresentaram potencial zeta de módulo superior a 20 mV, com exceção da amostra CdS/ZnS+, o que lhes confere estabilidade em suspensão, uma vez que sua agregação provavelmente será dificultada pela conformação tridimensional da quitosana e do bevacizumabe em sua superfície, além de sua carga eletrostática superficial.

A avaliação da atividade antiangiogênica apontou que, nas concentrações testadas, as suspensões de pontos quânticos conjugados ao bevacizumabe não apresentaram potencial antiangiogênico comparável ao do fármaco. Isto provavelmente se deve ao processo de conjugação do bevacizumabe à superfície dos pontos quânticos, que não mantém uma proporção comparável de moléculas de anticorpo em suspensão igual à do medicamento Avastin[®], em que estes se encontram na forma livre, um achado que já era esperado. A redução nesse potencial pode ainda estar relacionada ao comprometimento da porção Fc dos anticorpos, que pode também estar envolvida no processo de formação de neovasos. Para obter, com a suspensão de pontos quânticos, uma eficácia semelhante à do Avastin[®], é necessária a realização de estudos para determinação da dosagem ideal desses sistemas.

Os pontos quânticos foram administrados por via intravítrea em ratos saudáveis, e durante os 28 dias de acompanhamento, não foram detectadas quaisquer alterações estatisticamente significativas na função eletrofisiológica da retina. Variações transitórias nas amplitudes e tempos de registro das ondas dos eletrorretinogramas foram observadas,

porém com retorno aos valores normais com o tempo. Estes achados apontam que as suspensões administradas podem ser consideradas seguras, apresentando a princípio apenas efeitos na retina que são principalmente devidos à intervenção intraocular, não necessariamente às amostras.

Em relação à manutenção da PIO, uma mudança pontual foi verificada, porém de caráter transitório. A manutenção de níveis normais da PIO, torna possível afirmar que essas amostras não apresentam potencial de danos oculares quando de seu uso pontual.

A análise histológica não apresentou sinais de inflamação ou de infiltração celular na retina, entretanto, alterações verificadas na análise morfológica das camadas que formam a retina podem constituir indício de que um possível dano tardio possa vir a se desenvolver, assim, outros estudos são necessários para confirmar esta possibilidade. Além disso, os pontos quânticos CdS/ZnS- foram detectados em camadas intermediárias da retina em período superior a 28 dias, um achado que indica uma possibilidade de bioacumulação do sistema na retina, cujos efeitos a longo prazo devem ainda ser investigados. Entretanto, esse efeito não foi observado para os pontos quânticos conjugados ao anticorpo.

No desenvolvimento de novos sistemas para a terapêutica, a avaliação pré-clínica de segurança é uma importante etapa, que permite, além de verificar os possíveis efeitos deletérios *in vivo* destes, levantar possíveis formas de os eliminar ou mitigar. Isto pode ser alcançado por meio da otimização da síntese e composição do sistema, porém mantendo o uso de componentes e rotas de síntese biocompatíveis, como os empregados neste trabalho, o que é uma tendência atual na produção de medicamentos.

Os achados obtidos neste trabalho apontam que os pontos quânticos constituem uma ferramenta com grande potencial de aplicação para a oftalmologia, possibilitando não só a veiculação de fármacos, mas também oferecendo a propriedade de biomarcação de estruturas, podendo ser utilizados como ferramentas teranósticas em condições que afetam o segmento posterior do olho.

8 PERPECTIVAS FUTURAS

Suspensões de pontos quânticos têm demonstrado ser sistemas com grande potencial de aplicação na área farmacêutica e biomédica. Na oftalmologia, muitas ainda podem ser as vantagens de sua utilização como marcadores de estruturas oculares, por isso sua relevância e a atenção que tem recebido de alguns grupos ao redor do mundo.

O presente estudo mostrou que é baixa a capacidade desse sistema de causar efeitos deletérios graves e duradouros, sendo a maioria das alterações fisiológicas evidenciadas temporárias. Entretanto, aponta-se que é fundamental a realização de estudos *in vivo* mais (a nível crônico) para ratificar a segurança desse sistema, inclusive estabelecendo sua dose ideal.

O bevacizumabe, biofármaco anti-VEGF mais usado atualmente, foi utilizado neste estudo como anticorpo de ligação dos nanocristais. Além do VEGF, o interior do globo ocular apresenta uma variedade de outros antígenos de interesse que podem ser marcados com esses sistemas, a exemplo de antígenos de superfície expressos pelo epitélio pigmentar da retina, sítios de tração na interface vítreo-retina, focos de inflamação, entre outros. Também sugere-se estudos sobre a influência desses sistemas sobre outras rotas que conduzam à neovascularização, a exemplo da inflamação via COX-2.

É importante ressaltar que, devido à alta versatilidade desse sistema, outras condições de síntese, composições e revestimentos de partícula podem ser avaliados, com o objetivo de otimizar seu rendimento quântico e sua estabilidade. Assim, é possível que em breve esse tipo de sistema constitua uma importante ferramenta teranóstica no campo da oftalmologia.

REFERÊNCIAS

ACHOURI, D.; ALHANOUT, K.; PICCERELLE, P.; ANDRIEU, V. Recent advances in ocular drug delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1599-1617, 2013.

AMARAL-JÚNIOR, J. C.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, I. C.; MANSUR, H. S. Tunable luminescence of Cu-In-S/ZnS quantum dots-polysaccharide nano hybrids by environmentally friendly synthesis for potential solar energy photoconversion applications. **Applied Surface Science**, v. 542, p. 148701, 2021.

AMARAL-JÚNIOR, J. C.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, I. C.; MANSUR, H. S. Optically photoactive Cu-In-S@ ZnS core-shell quantum dots/biopolymer sensitized TiO₂ nanostructures for sunlight energy harvesting. **Optical Materials**, v. 121, p. 111557, 2021.

ANDERSEN, O. Chelation of cadmium. **Environmental health perspectives**, v. 54, p. 249-266, 1984.

BALARATNASINGAM, C.; DHRAMI-GAVAZI, E.; MCCANN, J. T.; GHADIALI, Q.; FREUND, K. B. Aflibercept: a review of its use in the treatment of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. **Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 9, p. 2355, 2015.

BANTSEEV, V.; ERICKSON, R.; LEIPOLD, D.; AMAYA, C.; MILLER, P. E.; BOOLER, H.; THACKABERRY, E. A. Nonclinical safety assessment of anti-factor D: key strategies and challenges for the nonclinical development of intravitreal biologics. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 1-2, p. 204-213, 2018.

BARISANI-ASENBAUER, T.; MACA, S. M.; MEJDOUBI, L.; EMMINGER, W.; MACHOLD, K.; AUER, H. Uveitis-a rare disease often associated with systemic diseases and infections-a systematic review of 2619 patients. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 7, n. 1, p. 57, 2012.

BAXTER, Sally L.; PISTILLI, Maxwell; PUJARI, Siddharth S.; LIESEGANG, Teresa L.; SHULER, Eric B.; THORNE, Jennifer E.; FOSTER, C. Stephen; JABS, Douglas A.; LEVI-CLARKE, Grace A.; NUSSENBLATT, Robert B.; ROSENBAUM, James T.; KEMPEN, John H. Risk of choroidal neovascularization among the uveitides. **American journal of ophthalmology**, v. 156, n. 3, p. 468-477. e2, 2013.

BERG, K.; PEDERSEN, T. R.; SANDVIK, L.; BRAGADÓTTIR, R. Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol. **Ophthalmology**, v. 122, n. 1, p. 146-152, 2015.

BHATTA, R. S.; CHANDASANA, H.; CHHONKER, Y. S.; RATHI, C.; KUMAR, D.; MITRA, K.; SHUKLA, P. K. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: in vitro and pharmacokinetics studies. **International journal of pharmaceuticals**, v. 432, n. 1, p. 105-112, 2012.

BILAN, R.; FLEURY, F.; NABIEV, I.; SUKHANOVA, A. Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging. **Bioconjugate chemistry**, v. 26, n. 4, p. 609-624, 2015.

BYE, Louise; MODI, Neil; STANFORD, Miles. **Basic sciences for ophthalmology**. OUP Oxford, 2013.

CAIRES, A. J.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, I. C.; CARVALHO, S. M.; MANSUR, H. S. Green synthesis of ZnS quantum dot/biopolymer photoluminescent nanoprobe for bioimaging brain cancer cells. **Materials Chemistry and Physics**, v. 244, p. 122716, 2020.

CARVALHO, I. C.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, S. M.; FLORENTINO, R. M.; MANSUR, H. S. L-cysteine and poly-L-arginine grafted carboxymethyl cellulose/Ag-In-S quantum dot fluorescent nanohybrids for in vitro bioimaging of brain cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 739-753, 2019.

CASCELLA, Raffaella; RAGAZZO, Michele; STRAFELLA, Claudia; MISSIROLI, Filippo; BORGIANI, Paola; ANGELUCCI, Francesco; MARSELLA, Luigi Tonino; CUSUMANO, Andrea; NOVELLI, Giuseppe; RICCI, Federico; GIARDINA, Emiliano. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. **Journal of ophthalmology**, v. 2014, 2014.

CEHAJIC-KAPETANOVIC, J.; MILOSAVLJEVIC, N.; BEDFORD, R. A.; LUCAS, R. J.; BISHOP, P. N. Efficacy and safety of glycosidic enzymes for improved gene delivery to the retina following intravitreal injection in mice. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 9, p. 192-202, 2018.

CHAKRAVARTHY, U.; HARDING, S. P.; ROGERS, C. A.; DOWNES, S.; LOTERY, A. J.; DAKIN, H. A.; MULDREW, A. A randomised controlled trial to assess the clinical effectiveness and cost-effectiveness of alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related Choroidal Neovascularisation (IVAN). **Health Technology Assessment** (Winchester, England), v. 19, n. 78, p. 1, 2015.

CHANG, J. H.; GARG, N. K.; LUNDE, E.; HAN, K. Y.; JAIN, S.; AZAR, D. T. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. **Survey of ophthalmology**, v. 57, n. 5, p. 415-429, 2012.

CHAVES, Claudilene Ribeiro. **Síntese, Silanização e Caracterização de Pontos Quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ Para Aplicações em Sistemas Biológicos**. Tese – Doutorado em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

CHEN, D.; WU, I. C.; LIU, Z.; TANG, Y.; CHEN, H.; YU, J.; CHIU, D. T. Semiconducting polymer dots with bright narrow-band emission at 800 nm for biological applications. **Chemical science**, v. 8, n. 5, p. 3390-3398, 2017.

CHEN, L.; LIU, Y.; LAI, C.; BERRY, R. M.; TAM, K. C. Aqueous synthesis and biostabilization of CdS@ ZnS quantum dots for bioimaging applications. **Materials Research Express**, v. 2, n. 10, p. 105401, 2015.

CHEN, Zong; QIU, Ping-Yang; MA, Chuan-Gen. Dexmedetomidine preconditioning protects against retinal ischemia/reperfusion injury and inhibits inflammation response via toll-like receptor 4 (TLR4) pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 1018-1024, 2017.

CRICK, Ronald Pitts; KHAW, Peng Tee. **A Textbook of Clinical Ophthalmology: A Practical Guide to Disorders of the Eyes and Their Management Third Edition**. World Scientific Publishing Company, 2003.

CUNHA, C. R. A.; OLIVEIRA, A. D. P. R.; FIRMINO, T. V. C.; TENÓRIO, D. P. L. A.; PEREIRA, G.; CARVALHO JR, L. B.; FONTES, A. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427-439, 2018.

DENNISTON, Alastair; MURRAY, Philip (Ed.). **Oxford handbook of ophthalmology**. OUP Oxford, 2014.

DIETRICH, M.; HELING, N.; HILLA, A.; HESKAMP, A.; ISSBERNER, A.; HILDEBRANDT, T.; FISCHER, D. Early alpha-lipoic acid therapy protects from degeneration of the inner retinal layers and vision loss in an experimental autoimmune encephalomyelitis-optic neuritis model. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 71, 2018.

DONG, Cun-Jian; AGEY, Peter; HARE, William A. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. **Visual neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 533-543, 2004.

DOURADO, L. F. N.; SILVA, C. N.; ARRIBADA, R. G.; SILVA-CUNHA, A. S. Assessment of Biocompatibility and Vascular Effects of Polymeric Materials Using Chick Chorioallantoic Membrane, an Alternative Method. **Macromolecular Symposia**. 2020. p. 2000046.

DUMAN, F. D.; ERKISA, M.; KHODADUST, R.; ARI, F.; ULUKAYA, E.; ACAR, H. Y. Folic acid-conjugated cationic Ag₂S quantum dots for optical imaging and selective doxorubicin delivery to HeLa cells. **Nanomedicine**, v. 12, n. 19, p. 2319-2333, 2017.

FALAVARJANI, K. Ghasemi; NGUYEN, Quan Dong. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. **Eye**, v. 27, n. 7, p. 787-794, 2013.

FERNANDEZ-BUENO, I.; JONES, R.; SORIANO-ROMANÍ, L.; LOPEZ-GARCIA, A.; GALVIN, O.; CHEETHAM, S.; DIEBOLD, Y. Histologic characterization of retina neuroglia modifications in diabetic zucker diabetic fatty rats. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 58, n. 11, p. 4925-4933, 2017.

FIALHO, Sílvia Ligório; JÚNIOR, Armando da Silva Cunha. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, p. 173-179, 2007.

FISHMAN, G. A.; BIRCH, D. G.; HOLDER, G. E.; BRIGELL, M. G. **Electrophysiologic testing in disorders of the retina, optic nerve, and visual pathway**. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology, 2001.

FLAMMER, Josef; MOZAFFARIEH, Maneli; BEBIE, Hans. **Basic Sciences in Ophthalmology: Physics and Chemistry**. Springer Science & Business Media, 2013.

FREITAS, D. V.; PASSOS, S. G.; DIAS, J. M.; MANSUR, A.; CARVALHO, S. M.; MANSUR, H.; NAVARRO, M. Toward greener electrochemical synthesis of composition-tunable luminescent CdX-based (X= Te, Se, S) quantum dots for bioimaging cancer cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 250, p. 233-243, 2017.

GAN, Li; WANG, Jing; JIANG, Min; BRALETT, Hanah; OUYANG, Defang; EPERJESI, Frank; LIU, Jianping; GAN, Yong. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5, p. 290-297, 2013.

GARCÍA-LAYANA, A.; FIGUEROA, M. S.; ARAIZ, J.; RUIZ-MORENO, J. M.; GÓMEZ-ULLA, F.; ARIAS-BARQUET, L.; REITER, N. Treatment of exudative age-related macular degeneration: focus on aflibercept. **Drugs & aging**, v. 32, n. 10, p. 797-807, 2015.

GIRMA, W. M.; FAHMI, M. Z.; PERMADI, A.; ABATE, M. A.; CHANG, J. Y. Synthetic strategies and biomedical applications of I–III–VI ternary quantum dots. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 31, p. 6193-6216, 2017.

GLASSPOOL, Michael G. **Atlas of Ophthalmology**. Springer Science & Business Media, 2012.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R. K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Nanoparticles laden in situ gel for sustained ocular drug delivery. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 162, 2013a.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R. K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Nanoparticles laden in situ gel of levofloxacin for enhanced ocular retention. **Drug delivery**, v. 20, n. 7, p. 306-309, 2013b.

GÜRAN, Ş.; ÇOBAN, Z. D.; FERMANLI, O.; AYDINGÖZ, E.; İPEK, E. Folic acid and zinc inhibit angiogenesis in chicken chorioallantoic membrane model via angiogenic factor genes. **Gulhane Medical Journal**, v. 60, n. 3, 2018.

HABOT-WILNER, Z.; MAZZA, O.; SHAHAR, J.; MASSARWEH, A.; MANN, I.; LOEWENSTEIN, A.; PERLMAN, I. Safety of intravitreal clindamycin in albino rabbit eyes. **Documenta Ophthalmologica**, v. 135, n. 2, p. 133-146, 2017.

HELENE, Otaviano; HELENE, André Frazao. Alguns aspectos da óptica do olho humano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, n. 3, p. 3312, 2011.

HESSEN, Michelle; AKPEK, Esen Karamursel. Dry eye: an inflammatory ocular disease. **Journal of ophthalmic & vision research**, v. 9, n. 2, p. 240, 2014.

HEYNEN, Henny; WACHTMEISTER, Lillemor; VAN NORREN, Dirk. Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. **Vision research**, v. 25, n. 10, p. 1365-1373, 1985.

HODLUR, R. M.; RABINAL, M. K. A new selenium precursor for the aqueous synthesis of luminescent CdSe quantum dots. **Chemical Engineering Journal**, v. 244, p. 82-88, 2014.

HOSSEINI, H.; NOWROOZZADEH, M. H.; SALOUTI, R.; NEJABAT, M. Anti-VEGF therapy with bevacizumab for anterior segment eye disease. **Cornea**, v. 31, n. 3, p. 322-334, 2012.

IRANMANESH, M.; MASHKANI, B.; SADEGHNIA, H. R.; FOROUZANFAR, F.; SAADATMANDZADEH, M.; GHORBANI, A.; SOUKHTANLOO, M. Effects of two new synthesized heterocyclic compounds on proliferation and tube formation of endothelial cells and on angiogenesis in chicken chorioallantoic membrane. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 74, n. 6, p. 1667-1673, 2017.

JHA, R.; SUR, V.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, T.; KUMAR, V.; KONAR, A.; HAZRA, S. Intracameral use of nepafenac: safety and efficacy study. **Current eye research**, v. 43, n. 5, p. 630-638, 2018.

JÓHANNESSON, G.; MOYA-ORTEGA, M. D.; ÁSGRÍMSDÓTTIR, G. M.; LUND, S. H.; THORSTEINSDÓTTIR, M.; LOFTSSON, T.; STEFÁNSSON, E. Kinetics of γ -cyclodextrin nanoparticle suspension eye drops in tear fluid. **Acta ophthalmologica**, v. 92, n. 6, p. 550-556, 2014.

KALAM, Mohd. Abdul; SULTANA, Yasmin; ALI, Asgar; AQIL, Mohd.; MISHRA, Anil K.; CHUTTANI, Krishna; ALJUFFALI, Ibrahim A.; ALSHAMSAN, Aws. Part II: enhancement of transcorneal delivery of gatifloxacin by solid lipid nanoparticles in comparison to commercial aqueous eye drops. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 6, p. 1828-1836, 2013.

KAMBHAMPATI, Siva P.; KANNAN, Rangaramanujam M. Dendrimer nanoparticles for ocular drug delivery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 151-165, 2013.

KANG, X.; HUANG, L.; YANG, Y.; PAN, D. Scaling up the aqueous synthesis of visible light emitting multinary AgInS₂/ZnS core/shell quantum dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 14, p. 7933-7940, 2015.

KARAMAN, H.; TUFEK, A.; KARAMAN, E.; TOKGOZ, O. Opioids Inhibit Angiogenesis in a Chorioallantoic Membrane Model. **Pain physician**, v. 20, n. 2S, p. SE11-SE21, 2017.

KAUR, Indu Pal; KAKKAR, Shilpa. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 100-112, 2014.

KIZAWA, J.; MACHIDA, S.; KOBAYASHI, T.; GOTOH, Y.; KUROSAKA, D. Changes of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with early diabetic retinopathy. **Japanese journal of ophthalmology**, v. 50, n. 4, p. 367-373, 2006.

KOMPELLA, U. B.; AMRITE, A. C.; RAVI, R. P.; DURAZO, S. A. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. **Progress in retinal and eye research**, v. 36, p. 172-198, 2013.

KUHNEN, R.; SILVA, F.; SCORTEGAGNA, A.; CABRAL, R. Fraturas de orbita: sinais e sintomas baseados nas estruturas anatomicas envolvidas. **International Journal of Dentistry**, v. 5, n. 1, 2009.

LAI, Kevin; LANDA, Gennady. Current choice of treatments for neovascular AMD. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 135-140, 2015.

LANG, Gerhard K. **Ophthalmology: A Pocket Textbook Atlas**; revised and enlarged- With 510 illustrations & 50 tables. Thieme, 2007.

LEE, R. W. J.; DICK, A. D. Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation. **Eye**, v. 26, n. 1, p. 17-28, 2012.

LIN, T. C.; HUNG, K. H.; PENG, C. H.; LIU, J. H.; WOUNG, L. C.; TSAI, C. Y.; HSU, C. C. Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 11, p. 635-641, 2015.

LIU, C. N.; PENG, Q.; YATES, D. W.; HUANG, W.; DEVANTIER, H.; AGUIRRE, S. A. Ocular safety assessment of sodium iodate in cynomolgus monkeys: characterization of a classic retinal toxicant. **Toxicology Research and Application**, v. 1, 2017.

MANSUR, A. A.; DE CARVALHO, F. G.; MANSUR, R. L.; CARVALHO, S. M.; DE OLIVEIRA, L. C.; MANSUR, H. S. Carboxymethylcellulose/ZnCdS fluorescent quantum dot nanoconjugates for cancer cell bioimaging. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 675-686, 2017.

MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S.; CARVALHO, S. M.; CAIRES, A. J. One-pot aqueous synthesis of fluorescent Ag-In-Zn-S quantum dot/polymer bioconjugates for multiplex optical bioimaging of glioblastoma cells. **Contrast media & molecular imaging**, v. 2017, 2017.

MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S.; MANSUR, R. L.; DE CARVALHO, F. G.; CARVALHO, S. M. Bioengineered II–VI semiconductor quantum dot–carboxymethylcellulose nanoconjugates as multifunctional fluorescent nanoprobe for bioimaging live cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 393-404, 2018.

MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S.; RAMANERY, F. P.; OLIVEIRA, L. C.; SOUZA, P. P. “Green” colloidal ZnS quantum dots/chitosan nano-photocatalysts for advanced oxidation processes: study of the photodegradation of organic dye pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 158, p. 269-279, 2014.

MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S.; SORIANO-ARAUJO, A.; LOBATO, Z. I. Fluorescent nanohybrids based on quantum dot–chitosan–antibody as potential cancer biomarkers. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 14, p. 11403-11412, 2014.

MANSUR, Alexandra; MANSUR, Herman; GONZÁLEZ, Juan. Enzyme-polymers conjugated to quantum-dots for sensing applications. **Sensors**, v. 11, n. 10, p. 9951-9972, 2011.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A.; SORIANO-ARAÚJO, A.; LOBATO, Z. I. Beyond biocompatibility: an approach for the synthesis of ZnS quantum dot-chitosan nano-immunoconjugates for cancer diagnosis. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1820-1830, 2015.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A.; SORIANO-ARAÚJO, A.; LOBATO, Z. I.; DE CARVALHO, S. M.; DE FATIMA LEITE, M. Water-soluble nanoconjugates of quantum dot-chitosan-antibody for in vitro detection of cancer cells based on “enzyme-free” fluoroimmunoassay. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 61-71, 2015.

MANSUR, Herman Sander. Quantum dots and nanocomposites. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 2, p. 113-129, 2010.

MARQUES, Marco E.; MANSUR, Alexandra A. P.; MANSUR, Herman S. Chemical functionalization of surfaces for building three-dimensional engineered biosensors. **Applied Surface Science**, v. 275, p. 347-360, 2013.

MATEA, C. T.; MOCAN, T.; TABARAN, F.; POP, T.; MOSTEANU, O.; PUIA, C.; MOCAN, L. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 5421, 2017.

MOLAN, Abdul-Lateef; WEI, Wen-Hua; VUTHIJUMNONK, Janyawat. Evaluation of Anti-angiogenic Activities of Aqueous Extracts of Regular and Selenium-rich Green Teas Using Chick Chorioallantoic Membrane as an Experimental Model. **American Journal of Life Science Researches**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2019.

NAGAI, N.; YAMADA, S.; KAWASAKI, J.; KOYANAGI, E.; SAIJO, S.; KAJI, H.; ABE, T. Pharmacokinetic and safety evaluation of a transscleral sustained unoprostone release device in monkey eyes. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 59, n. 2, p. 644-652, 2018.

NATESAN, S.; PANDIAN, S.; PONNUSAMY, C.; PALANICHAMY, R.; MUTHUSAMY, S.; KANDASAMY, R. (2017). Co-encapsulated resveratrol and quercetin in chitosan and peg modified chitosan nanoparticles: for efficient intra ocular pressure reduction. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1837-1845, 2017.

NGUYEN, Thanh T.; GUYMER, Robyn. Conbercept (KH-902) for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 541-548, 2015.

NISHIOKA, C.; LIANG, H. F.; BARSAMIAN, B.; SUN, S. W. Christopher et al. Sequential phases of RGC axonal and somatic injury in EAE mice examined using DTI and OCT. **Multiple sclerosis and related disorders**, v. 27, p. 315-323, 2019.

OLSON, J. L.; VELEZ-MONTOYA, R.; MANDAVA, N.; STOLDT, C. R. Intravitreal silicon-based quantum dots as neuroprotective factors in a model of retinal photoreceptor degeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 9, p. 5713-5721, 2012.

OSSWALD, C. R.; GUTHRIE, M. J.; AVILA, A.; VALIO Jr, J. A.; MIELER, W. F.; KANG-MIELER, J. J. *In vivo* efficacy of an injectable microsphere-hydrogel ocular drug delivery system. **Current eye research**, v. 42, n. 9, p. 1293-1301, 2017.

PARK, Youngrong; JEONG, Sanghwa; KIM, Sungjee. Medically translatable quantum dots for biosensing and imaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 30, p. 51-70, 2017.

PEREZ, Victor L.; CASPI, Rachel R. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. **Trends in immunology**, v. 36, n. 6, p. 354-363, 2015.

RAMANERY, F. P.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.

RETTINGER, Christina L.; WANG, Heuy-Ching. Quantitative assessment of retina explant viability in a porcine ex vivo neuroretina model. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 7, p. 521-530, 2018.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97-101, 2017.

RIBATTI, Domenico. **The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis**. Springer Science & Business Media, 2010.

ROCHA, M. N. A. M.; ÁVILA, M. P. D.; ISAAC, D. L. C.; MENDONÇA, L. S. D. M.; NAKANISHI, L.; AUAD, L. J. Prevalence of eye diseases and refractive errors in children seen at a referral center for ophthalmology in the central-west region, Brazil. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, n. 4, p. 225-229, 2014.

RÖSCH, S.; WERNER, C.; MÜLLER, F.; WALTER, P. Photoreceptor degeneration by intravitreal injection of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in rabbits: a pilot study. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 255, n. 2, p. 317-331, 2017.

SAADOUN, D.; BODAGHI, B.; BIENVENU, B.; WECHSLER, B.; SENE, D.; TRAD, S.; SÈVE, P. Biotherapies in inflammatory ocular disorders: interferons, immunoglobulins, monoclonal antibodies. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 7, p. 774-783, 2013.

SAJDAK, B. S.; BELL, B. A.; LEWIS, T. R.; LUNA, G.; CORNWELL, G. S.; FISHER, S. K.; CARROLL, J. Assessment of outer retinal remodeling in the hibernating 13-lined ground squirrel. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 59, n. 6, p. 2538-2547, 2018.

SANTANA, C. P.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-CUNHA Jr, A.; MANSUR, H. S. Bi-functional quantum dot-polysaccharide-antibody immunoconjugates for bioimaging and killing brain cancer cells in vitro. **Materials Letters**, v. 252, p. 333-337, 2019.

SANTANA, C. P.; MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S.; SILVA-CUNHA Jr, A. Bevacizumab-conjugated quantum dots: in vitro antiangiogenic potential and biosafety in rat retina. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 467-483, 2020.

SANTOS MOTTA, M. M.; COBLENTZ, J.; MELO, L. G. N. Aspectos atuais na fisiopatologia do edema macular diabético. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 45-9, 2008. 45-9.

SANTOS, Joyce C. C.; MANSUR, Alexandra A. P.; MANSUR, Herman S. One-step biofunctionalization of quantum dots with chitosan and n-palmitoyl chitosan for potential biomedical applications. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6550-6572, 2013.

SCHMID, M. K.; BACHMANN, L. M.; FÄS, L.; KESSELS, A. G.; JOB, O. M.; THIEL, M. A. Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 99, n. 2, p. 141-146, 2015.

SEMERARO, F.; CANCARINI, A.; REZZOLA, S.; ROMANO, M. R.; COSTAGLIOLA, C. Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. **Journal of diabetes research**, v. 2015, 2015.

SHEN, H. H.; CHAN, E. C.; LEE, J. H.; BEE, Y. S.; LIN, T. W.; DUSTING, G. J.; LIU, G. S. Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: new vehicles for ophthalmic drug delivery. **Nanomedicine**, v. 10, n. 13, p. 2093-2107, 2015.

SHRADER, Stephanie M.; GREENTREE, William F. Göttingen minipigs in ocular research. **Toxicologic pathology**, v. 46, n. 4, p. 403-407, 2018.

SILVA, F. O.; VIOL, L. C. D. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química nova**, v. 33, n. 9, p. 1933-1939, 2010.

SILVA, G. R.; LIMA, T. H.; ORÉFICE, R. L.; FERNANDES-CUNHA, G. M.; SILVA-CUNHA, A.; ZHAO, M.; BEHAR-COHEN, F. *In vitro* and *in vivo* ocular biocompatibility of electrospun poly (ϵ -caprolactone) nanofibers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 9-19, 2015.

SILVA, G. R.; SILVA-CUNHA Jr., A.; VIEIRA, L. C.; SILVA, L. M.; AYRES, E.; ORÉFICE, R. L.; FIALHO, S. L.; SALIBA, J. B.; BEHAR-COHEN, F. Montmorillonite clay based polyurethane nanocomposite as substrate for retinal pigment epithelial cell growth. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1309-1317, 2013.

SILVA, G. R.; SILVA-CUNHA, A.; BEHAR-COHEN, F.; AYRES, E.; ORÉFICE, R. L. Biodegradable polyurethane nanocomposites containing dexamethasone for ocular route. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 414-422, 2011.

SILVA, R. R.; FREITAS, D. V.; SOUSA, F. L.; JESUS, A. C.; SILVA, S. E.; MANSUR, A. A.; CARVALHO, S. M.; MARQUES, D. S.; CARVALHO, I. C.; AZEVEDO, W. M.; MANSUR, H. S.; NAVARRO, M. Synthesis of CuInS₂ and CuInS₂@ ZnX (X= S, Se) nanoparticles for bioimaging of cancer cells using electrochemically generated S₂-and Se₂. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 853, p. 156926, 2021.

SOARES, D. C. F.; DE PAULA OLIVEIRA, D. C.; BARCELOS, L. S.; BARBOSA, A. S.; VIEIRA, L. C.; TOWNSEND, D. M.; SILVA-CUNHA, A. Antiangiogenic activity of PLGA-Lupeol implants for potential intravitreal applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 394-402, 2017.

SONG, J. Y.; ARAVAND, P.; NIKONOV, S.; LEO, L.; LYUBARSKY, A.; BENNICELLI, J. L.; BENNETT, D. J. Amelioration of neurosensory structure and

function in animal and cellular models of a congenital blindness. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 6, p. 1581-1593, 2018.

SUSSADEE, M.; VORAWATTANATHAM, N.; PINYOPUMMIN, A.; PHAVAPHUTANON, J.; THAYANANUPHAT, A. Scotopic electroretinography in fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*). **Veterinary ophthalmology**, v. 20, n. 3, p. 266-270, 2017.

SUTRADHAR, Kumar Bishwajit; KHATUN, Sabera; LUNA, Irin Parven. Increasing possibilities of nanosuspension. **Journal of Nanotechnology**, v. 2013, 2013.

SWANDULLA, D.; ARMSTRONG, C. M. Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 5, p. 1736-1740, 1989.

TAKAHASHI, K.; IGARASHI, T.; MIYAKE, K.; KOBAYASHI, M.; YAGUCHI, C.; IJIMA, O.; SHIMADA, T. Improved intravitreal AAV-mediated inner retinal gene transduction after surgical internal limiting membrane peeling in cynomolgus monkeys. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 1, p. 296-302, 2017.

TANGSADTHAKUN, C.; KANOKPANONT, S.; SANCHAVANAKIT, N.; BANAPRASERT, T.; DAMRONGSAKKUL, S. Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 16, n. 1, 2017.

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V. V.; DOURADO, L. F. N.; PAIVA, M. R. B.; SILVA-CUNHA, A. Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. **Documenta Ophthalmologica**, p. 1-14, 2019.

TUOMELA, Annika; LIU, Peng; PURANEN, Jooseppi; RÖNKKÖ, Seppo; LAAKSONEN, Timo; KALESNYKAS, Giedrius; OKSALA, Olli; ILKKA, Jukka; LARU, Johanna; JÄRVINEN, Kristiina; HIRVONEN, Jouni; PELTONEN, Leena. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated

intraocular pressure in vivo. **International journal of pharmaceutics**, v. 467, n. 1, p. 34-41, 2014.

VARSHOCHIAN, R.; RIAZI-ESFAHANI, M.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAHMOUDI, A. R.; AGHAZADEH, S., MAHBOD, M.; DINARVAND, R. Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 10, p. 3148-3156, 2015.

VASCONCELOS, A.; VEGA, E.; PÉREZ, Y.; GÓMARA, M. J.; GARCÍA, M. L.; HARO, I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 609, 2015.

VEAMATAHAU, A.; JIANG, B.; SEIFERT, T.; MAKUTA, S.; LATHAM, K.; KANEHARA, M.; TACHIBANA, Y. Origin of surface trap states in CdS quantum dots: relationship between size dependent photoluminescence and sulfur vacancy trap states. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 4, p. 2850-2858, 2015.

VILLEGAS, V. M.; ARANGUREN, L. A.; KOVACH, J. L.; SCHWARTZ, S. G.; FLYNN JR, H. W. Current advances in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. **Expert opinion on drug delivery**, v. 14, n. 2, p. 273-282, 2017.

WANG, J.; LEI, C.; TAO, L.; WU, Q.; KE, X.; QIU, Y.; LEI, B. A safety study of high concentration and high frequency intravitreal injection of conbercept in rabbits. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 592, 2017.

YAMAMOTO, S.; MANABE, N.; FUJIOKA, K.; HOSHINO, A.; YAMAMOTO, K. Visualizing vitreous using quantum dots as imaging agents. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 6, n. 1, p. 94-98, 2007.

ZHANG, Kang; ZHANG, Liangfang; WEINREB, Robert N. Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 7, p. 541-559, 2012.

ZHAO, M.; RODRÍGUEZ-VILLAGRA, E.; KOWALCZUK, L.; Le NORMAND, M.; BERDUGO, M.; LEVY-BOUKRIS, R.; EL ZAOUI, Ikram; KAUFMANN, Béatrice; GURNY, Robert; BRAVO-OSUNA, Irene; MOLINA-MARTÍNEZ, I. T; HERRERO-VANRELL, Rocío; BEHAR-COHEN, Francine. Tolerance of high and low amounts of PLGA microspheres loaded with mineralocorticoid receptor antagonist in retinal target site. **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 187-197, 2017.

ZHAO, P.; XU, Q.; TAO, J.; JIN, Z.; PAN, Y.; YU, C.; YU, Z. Near infrared quantum dots in biomedical applications: current status and future perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 10, n. 3, p. e1483, 2018.

ZHAO, R.; LI, J.; WANG, J.; YIN, Z.; ZHU, Y.; LIU, W. Development of timolol-loaded galactosylated chitosan nanoparticles and evaluation of their potential for ocular drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 997-1008, 2017.